

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Neurovědy



**MUDr. EVA KRASULOVÁ**

**Lymfocytární subpopulace, cytokinová produkce  
a transplantace kmenových buněk  
u pacientů s roztroušenou sklerózou**

**Lymphocyte subpopulations, cytokine production  
and stem cells transplantation  
in multiple sclerosis patients**

Disertační závěrečná práce

Školitel: Prof. MUDr. Eva Havrdová, CSc.

Neurologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

Konzultant: As. MUDr. Helena Marečková, CSc.

Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK a VFN v Praze

Praha, 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 20.11.2012

MUDr. EVA KRASULOVÁ

Podpis

## PODĚKOVÁNÍ

V úvodu své práce bych především ráda poděkovala mé školitelce Prof. MUDr. Evě Havrdové, CSc. za možnost pracovat od počátku svého postgraduálního studia pod jejím vedením v Centru pro demyelinizační onemocnění Neurologické kliniky 1. LF UK a VFN. Na tomto vysoce kvalitním a v zahraničí ceněném pracovišti jsem za optimálního spojení klinické a vědecké práce mohla systematicky získávat a zpracovávat potřebná data pro odborné publikace a tuto disertační práci. Mé poděkování tímto zároveň patří i všem kolegům našeho centra a kolegům ze spolupracujících hematologických pracovišť (I. interní klinika hematoonkologie 1. LF UK a VFN, Oddělení klinické hematologie 3. LF UK a FNKV) za jejich týmovou spolupráci v péči o pacienty s roztroušenou sklerózou, která je podkladem pro naši vědeckou práci, i za podnětné poznámky k této disertační práci.

Dále chci poděkovat As. MUDr. Heleně Marečkové, CSc. za uvedení do imunologické problematiky roztroušené sklerózy, spolupráci při vyhodnocování imunologických parametrů a připomínky k této práci.

Stejně poděkování patří také As. MUDr. Davidu Kemlinkovi, PhD. za zasvěcení do statistických metod a pomoc s vyhodnocováním dat a důležité poznámky k výsledkům práce.

Ráda bych na tomto místě poděkovala také pacientům s roztroušenou sklerózou, bez jejichž souhlasu a ochoty by nebylo možno tento výzkum uskutečnit.

Projekt byl podporován granty IGA MZ ČR NR/9375-3/2007, IGA MZ ČR 1A8713-5/2005 a GAČR 309/08/H079.

# OBSAH

PODĚKOVÁNÍ.....	3
OBSAH.....	4
ABSTRAKT.....	6
ABSTRACT.....	7
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	9
1. ÚVOD.....	11
1.1. Etiologie roztroušené sklerózy a imunitní systém.....	11
1.2. Účast jednotlivých subpopulací imunitních buněk na patogenezi roztroušené sklerózy a vznik zánětlivého ložiska v CNS.....	13
1.2.1. T-lymfocyty – buněčná odpověď specifické imunity .....	14
1.2.2. B-lymfocyty a plazmatické buňky – humorální odpověď specifické imunity .....	16
1.2.3. Monocyty, makrofágy, mikroglie .....	17
1.2.4. Natural killers (přirození zabíječi) – buněčná odpověď přirozené imunity .....	18
1.2.5. Cytokiny .....	19
1.3. Roztroušená skleróza, klinicky izolovaný syndrom a neuromyelitis optica .....	23
1.3.1. Definice a diagnostická kritéria (roztroušená skleróza a klinicky izolovaný syndrom) .....	23
1.3.2. Průběhy onemocnění .....	29
1.3.3. Prognóza onemocnění a prognostické markery .....	30
1.3.4. Neuromyelitis optica (morbus Devic) .....	31
1.3.5. Léčba .....	32
2. CÍLE PRÁCE .....	41
3. PACIENTI A METODY .....	42
3.1. Pacienti s klinicky izolovaným syndromem léčení interferonem beta .....	42
3.2. Pacienti s roztroušenou sklerózou léčení natalizumabem .....	43
3.3. Pacienti s roztroušenou sklerózou léčení vysokodávkovanou imunoabací s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk (ASCT) .....	44
3.3.1. Prospektivně sledovaná skupina pacientů léčených ASCT .....	45
3.3.2. Retrospektivně sledovaná skupina pacientů léčených ASCT v letech 1998-2008 .....	47
3.4. Allogenní transplantace kmenových buněk v léčbě autoimunitních onemocnění – kazuistika RS a NMO .....	48
3.4.1. Kazuistika pacientky se sekundárně progresivní RS léčené alloSCT pro diagnózu myelodysplastického syndromu .....	48
3.4.2. Kazuistika pacientky s neuromyelitis optica léčené alloSCT .....	49
3.5. Metody vyšetření lymfocytárních subpopulací a intracelulárních cytokinů .....	51
3.5.1. Média, reagenty a protilátky .....	51
3.5.2. Průtoková cytometrie .....	52
3.6. Statistická analýza.....	54
4. VÝSLEDKY .....	56
4.1. Výsledky retrospektivního sledování skupiny pacientů léčených vysokodávkovanou imunoabací s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk (ASCT) v letech 1998-2008 .....	56
4.1.1. Klinické výstupy – počet relapsů, progres, léčba po ASCT .....	56
4.1.2. Bezpečnost.....	60
4.2. Prospektivní sledování vývoje lymfocytárních subpopulací a intracelulárních cytokinů v periferní krvi.....	61

4.3. Výsledky statistického zpracování lymfocytárních subpopulací a intracelulárních cytokinů souhrnně u vybraných tří skupin pacientů ve vztahu ke klinické aktivitě onemocnění .....	64
4.4. Hodnocení léčby allogenní transplantací kmenových buněk u dvou pacientek s autoimunitním onemocněním CNS (efektivita a bezpečnost).....	68
4.4.1. Kazuistika pacientky se sekundárně progresivní RS léčené alloSCT pro diagnózu myelodysplastického syndromu .....	68
4.4.2. Kazuistika pacientky s neuromyelitis optica léčené alloSCT .....	69
5. DISKUZE.....	71
6. ZÁVĚR .....	80
7. LITERATURA.....	82
PŘÍLOHA č. 1 – IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM .....	93
PŘÍLOHA č. 2 – SOUHRN PRACÍ AUTORKY .....	94

## ABSTRAKT

Roztroušená skleróza (RS) představuje demyelinizační onemocnění centrálního nervového systému se známou autoimunitní etiologií. V současné době máme k dispozici diagnostická kritéria, která umožňují stanovení diagnózy již po první atace klinických příznaků. Zároveň je využívána řada léků, kterými můžeme redukovat aktivitu onemocnění a oddálit stádium nevratné invalidity. Prognózu individuálního pacienta a adekvátní léčbu však zatím určujeme jen nedokonale na základě klinické zkušenosti a magnetické rezonance mozku. Přesnější prognostické ukazatele u RS chybí.

Cíle práce: 1. Vytipovat vhodný prognostický imunologický parametr periferní krve u pacientů s RS v různém stádiu onemocnění a léčby; 2. Popsat skupinu pacientů léčených autologní transplantací kmenových buněk (ASCT) nebo allogenní transplantací kmenových buněk (alloSCT) ve vztahu k efektu, nežádoucím účinkům a vhodným indikačním kritériím k této léčbě.

Pacienti a metody: V první části studie bylo zahrnuto 33 pacientů s klinicky izolovaným syndromem, 17 pacientů s RS léčených natalizumabem a 14 pacientů s agresivní RS léčených ASCT. U pacientů byl hodnocen neurologický nálezní pomocí standardní škály EDSS (Expanded Disability Status Scale) a přítomnost relapsů před zahájením vybrané léčby a ve 3., 6., 12. a 24. měsíci od zahájení léčby. Ve stejných intervalech byl proveden odběr periferní krve a pomocí průtokové cytometrie stanoveno zastoupení základních lymfocytárních subpopulací a hladiny intracelulárních cytokinů. Ke statistickému zpracování bylo využito t-testu, ANOVA a regresní analýzy. Ve druhé části byla zpracována klinická data (EDSS, počet relapsů, dlouhodobá léčba RS, nežádoucí účinky) 26 pacientů léčených ASCT na našem pracovišti v letech 1998-2008. Zároveň byly popsány dvě kazuistiky pacientek léčených alloSCT (u RS a dalšího demyelinizačního onemocnění CNS – neuromyelitis optica (NMO)). Statistické zpracování zahrnovalo Kaplan-Meierovu křivku se zjištěním progression free survival (PFS) a porovnání PFS vytipovaných skupin pacientů pomocí Coxova F testu.

Výsledky: Graficky byl zpracován paralelně v absolutních (abs) i procentuálních (%) hodnotách vývoj jednotlivých lymfocytárních subpopulací v průběhu dvouletého sledování u všech tří skupin pacientů. V rámci souhrnné analýzy byl nalezen statisticky významný rozdíl ve vstupní hodnotě CD19+abs B-lymfocytů u pacientů bez progresse versus s progresí ( $p=0,01$ ), hodnocené vývojem EDSS ve 24. měsíci sledování. Absolutní hodnota 0,2 CD19+lymfocytů před léčbou odlišila pacienty bez progresse oproti pacientům s progresí se sensitivitou 81% a specifitou 46%. Prediktivní potenciál byl statisticky významnější využitím kombinace vstupní hodnoty absCD19+ lymfocytů s CD3+% lymfocyty ve 3. měsíci od zahájení terapie ( $p<0,001$ ).

V rámci druhé části práce bylo dosaženo intervalu bez progresse (PFS) u celé skupiny pacientů léčených ASCT 70,8% po třiletém a 29,2% po šestiletém sledování. PFS v rámci třiletého sledování u pacientů s relaps-remitentní RS byl 84,4% ve srovnání s 60% u pacientů se sekundárně-progresivní RS ( $p=0,00002$ ). PFS po třech letech ve skupině pacientů s délkou trvání RS < 5 let činil 82,3% ve srovnání s 61,8% ve skupině pacientů s délkou trvání RS  $\geq$  5 let ( $p=0,00217$ ). Statistické významnosti dosáhl rovněž rozdíl mezi křivkami PFS u pacientů s věkem pod 35 let oproti starším pacientům ( $p=0,01118$ ). Léčba ASCT v našem souboru byla relativně bezpečná, mortalita spojená s výkonem byla 0%. Dobře tolerovanou a účinnou se ukázala být také léčba alloSCT u dvou pacientek s demyelinizačním onemocněním CNS.

Závěr: V rámci práce byl nalezen možný prediktivní faktor progresse invalidity u RS - absolutní hodnota CD19+ B-lymfocytů periferní krve. Práce ukázala na vhodnost dalšího výzkumu základních imunologických parametrů periferní krve ve vztahu k predikci RS.

V práci byla dále definována vhodná indikační kritéria pro léčbu ASCT, která byla vyhodnocena jako relativně bezpečná. Léčba alloSCT ukázala možný potenciál k ovlivnění autoimunitních onemocnění CNS včetně prognosticky nepříznivé NMO. Také tato metoda léčby byla u dvou referovaných pacientek dobře tolerována.

## ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) represents a demyelinating disease of the central nervous system with known autoimmune etiology. Currently new diagnostic criteria are used allowing us to diagnose MS early after first relapse of clinical symptoms. Several drugs are available to reduce disease activity and postpone later MS stages with irreversible disability. Prognosis of an individual patient and accurate treatment is however defined only imperfectly based on our clinical experience and brain magnetic resonance imaging. Specific prognostic markers are missing.

**Aims:** 1. To identify suitable prognostic immunological marker from peripheral blood of MS patients in different disease stages and under different treatment regimens; 2. To describe group of MS patients treated with autologous stem cells transplantation (ASCT) or allogeneic stem cells transplantation (alloSCT) with respect to efficacy, adverse events and accurate patient selection.

**Patients and methods:** In the first part of the study we involved 33 patients with clinically isolated syndrome, 17 MS patients treated with natalizumab and 14 patients with aggressive MS treated with ASCT. Disability measured by Expanded Disability Status Scale (EDSS) as well as relapse rate were evaluated before treatment (baseline) and after 3, 6, 12 and 24 months after treatment initiation. In the same time-points peripheral blood was drawn and basic lymphocyte subpopulations and intracellular cytokines were examined using flow cytometry. T-test, ANOVA and multiple regression analysis were used for statistical analysis. In the second part of the study we collected clinical data (EDSS, relapse-rate, long-term MS treatment, adverse events) of 26 MS patients treated with ASCT (during period 1998-2008). We described two case-reports of alloSCT treatment as well (in MS and other demyelinating CNS disorder – neuromyelitis optica (NMO)). For statistical analysis Kaplan-Meier curve with progression free survival (PFS) calculation was used together with comparison of PFS of selected patient subgroups using Cox F test.

**Results:** Two-year follow-up of peripheral blood lymphocyte subpopulations in all three groups of patients (percentage (%) and absolute (abs) values) was described. Inter-group analysis showed significant difference in CD19+abs lymphocyte count at baseline between progressors and non-progressors measured by EDSS at month 24 ( $p=0.01$ ). Threshold of 0.2 in CD19+abs lymphocyte count at baseline distinguished progressors and non-progressors with sensitivity 81% and specificity 46%. Predictive potential was statistically even more significant combining baseline CD19+abs lymphocytes and CD3+% lymphocytes at month 3 ( $p<0.001$ ).

In the second part, at 3 and 6 years of follow-up 70.8% and 29.2% of patients treated with ASCT respectively were free of progression. Within three-year follow-up PFS was 84.4% in relapsing-remitting patients and 60% in secondary-progressive patients ( $p=0.00002$ ). In the group of patients with MS duration < 5 years PFS achieved 82.3% in comparison with 61.8% in patients with MS duration  $\geq 5$  years ( $p=0.00217$ ). There was also statistically significant difference between PFS in patients under age of 35 and older patients ( $p=0.01118$ ). Treatment related mortality was 0% and ASCT procedure was relatively safe. Also alloSCT treatment was well-tolerated and effective in both patients with demyelinating CNS disorder.

Conclusion: Possible predictive marker of disability progression in MS was found in this study – absolute CD19+ B-lymphocyte count in peripheral blood. This work has shown that further research of basic immunological markers in peripheral blood is advisable in connection to MS prediction. In this work selection criteria for ASCT treatment were defined and treatment was evaluated as relatively safe. AlloSCT treatment showed possible efficacy in autoimmune diseases of the CNS including NMO with known poor prognosis. In our two patients even this treatment was well-tolerated.



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
AlloSCT	Allogeneic Stem Cells Transplantation (allogenní/heterologní transplantace kmenových buněk)
APC	AlloPhycoCyanin
ASCT	Autologous Stem Cells Transplantation (autologní transplantace kmenových buněk)
ATG	AntiThymocytární Globulin
BEAM	BCNU=carmustin, Etoposid, cytosin Arabinosid, Melfalan (chemoterapeutický režim)
BCR	B-cell Receptor (B Buněčný Receptor)
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BFA	Brefeldin A (transport inhibitor protein)
CD	Cluster of Differentiation (klasifikace povrchových molekul imunitních buněk)
CDMS	Clinically Definite Multiple Sclerosis (klinicky definitivní roztroušená skleróza)
CIS	Clinically Isolated Syndrome
CNS	Centrální Nervový Systém
CSF	Cerebrospinal Fluid (mozkomíšní mok, likvor)
DMD	Disease Modifying Drugs
EAE	Experimentální Autoimunitní Encefalomyelitida (zvířecí model RS)
EBMT	The European Group for Blood and Marrow Transplantation
EBV	Epstein-Barrové virus
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate (fluorochrom)
FSC	Forward scatter
GvHD	Graft versus Host Disease (reakce štěpu proti hostiteli)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
Ig	Imunoglobulin (protilátka)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL2RA	Alfa-řetězec Receptoru pro InterLeukin 2
IL7RA	Alfa-řetězec Receptoru pro InterLeukin 7

IRI	Imunoregulační Index
KIR	Killer Inhibitor Receptor (povrchový receptor NK-buněk)
LPS	Lipopolysacharid (mitogen)
MBP	Myelinový Bazický Protein
MDS	MyeloDysplastický Syndrom
MHC	Major Histocompatibility Complex
MR	Magnetická Rezonance
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (ribonukleová kyselina)
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule (CD56)
NK	Natural Killer (přirozený zabíječ)
NMO	NeuroMyelitis Optica (Devicova nemoc)
NT3	Neurotrophin 3
PE	Phycoerythrin (fluorochrom)
PerCP	Peridinin chlorophyll protein (fluorochrom)
PFS	Progression-Free Survival
PHA	Phytohaemagglutinin
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate (mitogen)
PP-RS	Primárně-Progresivní Roztroušená Skleróza
RAEB	Refractory Anemia with Excess of Blasts
rpm	Revolutions per minute (jednotka výkonu rotoru centrifugy)
RPMI	„Roswell Park Memorial Insitute“ medium 1640
RR-RS	Relaps-Remitentní Roztroušená Skleróza
RS	Roztroušená Skleróza
S1P	Sfingosin 1-Phosphate (fosfát)
SLE	Systémový Lupus Erythematodes
SSC	Side scatter
SP-RS	Sekundárně-Progresivní Roztroušená Skleróza
TCR	T-cell Receptor (T Buněčný Receptor)
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta (transformující růstový faktor beta)
TLR	Toll-Like Receptor
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrotizující Faktor alfa
TRM	Transplant Related Mortality
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

# 1. ÚVOD

## 1.1. Etiologie roztroušené sklerózy a imunitní systém

Roztroušená skleróza (RS) s prevalencí kolem 170/100 000 obyvatel představuje v České republice nejčastější autoimunitní onemocnění centrálního nervového systému (CNS) (Havrdova 2001; Vachová 2010). Etiologie onemocnění je multifaktoriální s podílem vnitřních (genetických) faktorů i faktorů zevního prostředí. Všechny dosud známé rizikové faktory pro rozvoj RS mají v souladu s autoimunitní podstatou onemocnění jednoznačný vztah k imunitnímu systému. Dysimunní podstatu RS potvrzuje také charakter ložisek v CNS s přítomností perivaskulárních lymfocytárních infiltrátů a průkazem četných buněk přirozené i specifické imunity a jejich zánětlivých působků. V neposlední řadě pak imunopatogenezi onemocnění potvrzuje také účinnost imunomodulačních a imunosupresivních léčebných postupů, které jsou v současné době v léčbě RS využívány.

V rámci výzkumu genetických faktorů byla zkoumána řada alel s potenciálním vztahem k RS již od 70. let, kdy byla nejprve popsána souvislost mezi RS a geny hlavního histokompatibilního komplexu (major histocompatibility complex, MHC) I. třídy lokalizovanými na 6p21 chromozomu lidského genomu (Jersild 1972). Dosud nejsilnější asociace s vnímavostí k onemocnění byla posléze opakovaně prokázána u alely MHC II. třídy HLA-DRB1\*1501 genomu s relativním rizikem vyšším než 5 (Olerup a Hillert 1991; Ramagopalan, Knight et al. 2009). MHC molekuly II. třídy jsou exprimovány na povrchu antigen prezentujících buněk společně s antigenem, který se tak stává rozpoznatelným pro CD4<sup>+</sup> T-lymfocyt. Jedná se o interakci nezbytnou pro správnou obrannou funkci buněčné specifické imunity i udržení auto-tolerance v organismu, i když přesná podstata vztahu polymorfismu jednotlivých alel a autoimunitních onemocnění není známa. V posledních letech byly objeveny v rámci celogenomových asociačních studií i některé non-MHC geny se vztahem k RS, i když relativní riziko RS u těchto alel dosahuje oproti asociaci s HLA pouze výše 1,1-1,5. Jedná se o alfa řetězec receptoru pro interleukin 2 (IL2RA) a interleukin 7 (IL7RA) (Hafler, Compston et al. 2007; Weber, Fontaine et al. 2008). Oba typy interleukinů hrají důležitou roli pro růst a diferenciaci T- a B-lymfocytů. Interleukin 2 je růstovým faktorem pro antigenem stimulované T-lymfocyty a je zodpovědný za klonální expanzi těchto buněk po setkání s antigenem. Rovněž stimuluje funkci regulačních T-lymfocytů, které

představují jednu z linií periferní autotolerance lidského organismu. Interleukin 7 působí jako růstový faktor pro lymfoidní prekurzory včetně vývoje  $\gamma/\delta$  T-lymfocytů (He a Malek 1996), které se hojně vyskytují v oblastech autoimunitního zánětu v CNS u RS. Vzhledem k uplatnění většího počtu tzv. minor genů na rozvoji RS je toto onemocnění označováno jako polygenní. Individuální genetické pozadí jednotlivce pak může vést nejen k vyšší vnímavosti k RS, ale zřejmě také k individuálnímu průběhu choroby a odpovídavosti na jednotlivé léčebné postupy. V tomto ohledu zatím probíhá intenzivní výzkum na mezinárodní úrovni zahrnující desítky tisíc pacientů z různých geografických regionů.

Genetické pozadí představuje jeden z možných rizikových faktorů pro rozvoj RS, nicméně genetická predispozice sama o sobě k onemocnění nevede. Jednoznačným důkazem pro toto tvrzení je současný výskyt RS u obou jednovaječných dvojčat pouze v 25-30% případů (Ebers 2005). Je zde tedy evidentní vliv dalších faktorů zevního prostředí. V současné době je nejčastěji zmiňován nedostatek vitamínu D, infekce zejména virovými agens a kouření.

Vliv vitamínu D byl nejprve teoreticky dán do souvislosti se známým severojižním gradientem prevalence RS (jižním směrem s nárůstem slunečního osvětlení a tím i kožní produkce vitamínu D klesá prevalence RS) (Hayes, Cantorna et al. 1997). Nižší hladina vitamínu D v séru pacientů s RS byla posléze prokázána v období relapsu onemocnění ve srovnání s remisí (Soilu-Hanninen, Airas et al. 2005; Soilu-Hanninen, Laaksonen et al. 2008). Postupně byla objevena řada imunologických mechanismů, kterými se vitamín D uplatňuje v přirozené i specifické imunitě. Intracelulární receptory pro vitamín D exprimují monocyty a makrofágy. Touto cestou vitamín D podporuje účinnou obranu proti intracelulárnímu patogenu *Mycobacterium tuberculosis*, jehož infekce je doprovázena známým zvýšením sérových hladin vitamínu D (Epstein, Stern et al. 1984; Rook, Steele et al. 1986). Receptory pro vitamín D exprimují také dendritické buňky, jejichž hlavní funkcí je prezentace antigenu. Podání vitamínu D způsobuje útlum vyžívání těchto buněk (Adorini, Penna et al. 2003). Recentní výzkumy in vitro navíc ukazují možný pozitivní vliv vitamínu D na navození tolerance také v oblasti specifické imunity (Peelen, Knippenberg et al. 2011) a schopnost vitamínu D inhibovat zvířecí model RS – experimentální autoimunitní encefalomyelitidu (EAE) (Chang, Cha et al. 2010; Mayne, Spanier et al. 2011). Proto je nyní výzkum v této oblasti zaměřen na adekvátní suplementaci vitamínem D a její bezpečnost v rámci prevence a léčby RS (Smolders, Hupperts et al. 2011).

Indukce autoimunitního onemocnění je rovněž často spojována s infekcemi, zejména virovými. To potvrzuje i klinická zkušenost, kdy je infekce častým spouštěčem relapsu RS.

V rámci virového infektu může dojít ke zkřížené reakci mezi tělu vlastními antigeny a virovými epitopy – tzv. molekulární mimikry. Řadu let je ve vztahu k RS podrobně zkoumán především virus Epstein-Barr (EBV). V průběhu jeho infekce je v souvislosti s klonální proliferací B-lymfocytů popsána produkce autoreaktivních protilátek (Vaughan, Nguyen et al. 1995; Vaughan, Valbracht et al. 1995). Také některé retrospektivní studie vyhodnotily určité zvýšené riziko rozvoje RS u osob, které prodělaly do osmnácti let věku infekční mononukleózu způsobenou EBV (relativní riziko RS 7,9 (Martyn, Cruddas et al. 1993) respektive 2,81 (Haahr, Koch-Henriksen et al. 1995)). Opakovaně bylo popsáno vyšší procento EBV-séropozitivity u pacientů s RS ve srovnání se zdravými kontrolami (99% versus 90-95%) (Bray, Bloomer et al. 1983; Sumaya, Myers et al. 1985; Wandinger, Jabs et al. 2000; Haahr and Hollsberg 2006; Ascherio a Munger 2007). Partikule EBV viru byly průkazné v sekčních vzorcích CNS 21 z 22 zkoumaných pacientů s RS (Serafini, Rosicarelli et al. 2007). Byly navíc asociovány s B-lymfocyty, organizovanými ve folikulech na meningách, kde zřejmě dochází ke kompartmentalizaci a tím chronickému udržování aktivity zánětu za hematoencefalickou bariérou u pacientů s RS (Magliozzi, Howell et al. 2007; Serafini, Rosicarelli et al. 2007).

Jako další rizikový faktor pro vznik RS a klinickou i magneticko-rezonanční (MR) progresi onemocnění bylo v posledních letech označeno kouření (Handel, Williamson et al. 2011; Hedstrom, Baarnhielm et al. 2011; Palacios, Alonso et al. 2011; Healy, Ali et al. 2009; Zivadinov, Weinstock-Guttman et al. 2009). Také v tomto případě lze poukázat na negativní zásah zplodin cigaretového kouře do imunitního systému, zejména cestou toxických kyslíkových radikálů s aktivací přirozené imunity a preferenčně vývojem autoimunitních klonů lymfocytů Th17, jak bylo prokázáno u jiných autoimunitních onemocnění (Torii, Saito et al. ; Onozaki 2009).

## **1.2. Účast jednotlivých subpopulací imunitních buněk na patogenezi roztroušené sklerózy a vznik zánětlivého ložiska v CNS**

V patogenezi RS dochází k uplatnění většiny buněčných a humorálních mechanismů přirozené i specifické imunity. Ústřední role je stále přisuzována T-lymfocytům.

### 1.2.1. T-lymfocyty – buněčná odpověď specifické imunity

T-lymfocyty se v organismu vyvíjejí v thymu, kde jsou vybaveny T-buněčným receptorem (Olerup, Olsson et al.) a povrchovými molekulami CD3, CD4 a CD8. Postupným vyžíváním se pak vytváří několik skupin funkčně odlišných T-lymfocytů. Pomocné CD4+ T-lymfocyty (tzv. helpery, Th) stimulují svými působky proliferaci specifických T-lymfocytů, B-lymfocytů, CD8+ buněk a přirozených zabíječů (natural killers) – NK buněk. Antigen je těmto buňkám prezentován ve spojení s molekulou MHC II. třídy. Podle cytokinové produkce rozpoznáváme Th1 a Th2 subpopulaci pomocných T-lymfocytů. Th1 buňky produkují především interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukin-2 (IL-2), a tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- $\alpha$ ). Jsou zodpovědné za buněčnou obranu proti intracelulárním mikroorganismům a za reakci oddálené přecitlivělosti. Za patologických okolností jsou spojeny s autoimunitní reakcí a rejekcí štěpu. Th2 subpopulace produkuje zejména interleukiny IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 a IL-13 a mají svou úlohu v alergické reakci a v obraně proti parazitům (Havrdova 2001). Kromě těchto dvou dobře definovaných podtypů pomocných T-lymfocytů, které byly popsány Mosmannem a kol. již v roce 1986 (Mosmann, Cherwinski et al. 1986), jsou dnes ve vztahu k autoimunitě zmiňovány také buňky s označením Th17, charakterizované produkcí interleukinu 17. Knock-out myši pro gen interleukinu 17 mají oddálený vznik a méně agresivní průběh EAE (Komiyama, Nakae et al. 2006). Zvýšená exprese genu pro interleukin 17 byla nalezena zejména v chronických lézích u RS (Lock, Hermans et al. 2002).

V periferní krvi zdravých jedinců nacházíme autoreaktivní klon T-lymfocytů (Compston 2006), mezi nimiž byly nalezeny linie specifické přímo vůči myelinovému bazickému proteinu (MBP), jednomu z hlavních autoantigenů myelinu CNS (Pette, Fujita et al. 1990). U pacientů s RS jsou tyto lymfocyty (především CD4+ T-lymfocyty) na základě různých podnětů (např. již zmíněné virové infekce) aktivovány a klonální expanzí pomnoženy (Zhang, Markovic-Plese et al. 1994), čímž dochází k prolomení autotolerance. Aktivované lymfocyty produkují prozánětlivé cytokiny interleukin-2 (IL-2), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) a tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- $\alpha$ ) (Voskuhl, Martin et al. 1993), které stimulují expresi adhezivních molekul na endoteliálních buňkách hematoencefalické bariéry. Tím je umožněn transendoteliální přestup autoagresivních lymfocytů do CNS - tzv. homing do místa výskytu příslušného autoantigenu (Wekerle, Schwab et al. 1986; Hickey 1991). Uvedené encefalitogenní CD4+ T-lymfocyty svou cytokinovou produkcí odpovídají klasickým pomocným Th1-lymfocytům, nicméně u nich opakovaně byla popsána cytotoxická aktivita

(Richert, Robinson et al. 1989; Martin, Jaraquemada et al. 1990) a jedná se o buněčnou subpopulaci hrající zásadní roli ve formování zánětlivé léze (plaky) v CNS u RS.

Bylo prokázáno, že CD4<sup>+</sup>-T-lymfocyty periferní krve specifické vůči myelinovému antigenu jsou u RS rekrutovány především ze subpopulace naivních buněk (CD45RA) a nikoli ze subpopulace buněk paměťových (CD45RO) (Muraro, Pette et al. 2000).

Z hlediska periferních mechanismů autotolerance je velmi důležitou skupinou CD4<sup>+</sup>-T-lymfocytů subpopulace regulačních (Miniero, Tardivo et al.) buněk, které jsou charakterizovány molekulami CD4, CD25 ( $\alpha$ -řetězec receptoru pro IL-2) a Foxp3 (transkripční faktor). Mutace genu Foxp3 je zodpovědná za X-vázaný syndrom IPEX (Imunitní dysregulace, Polyendokrinopatie, Enteropatie, X-vázaný syndrom), který je spojen s autoimunitními onemocněními několika orgánů (diabetes mellitus 1. typu, autoimunitní thyreoditis, autoimunitní zánět střev) (Sakaguchi 2005). U pacientů s RS byl opakovaně popsán deficit a nedostatečná funkce Treg lymfocytů, což znamená další možný mechanismus narušení autotolerance při vzniku onemocnění (Haas, Fritzsche et al. 2007; Venken, Hellings et al. 2008; Fletcher, Lonergan et al. 2009).

T-lymfocyty, které exprimují na svém povrchu molekulu CD8 a antigen rozpoznávají v kontextu molekul MHC I. třídy, představují tzv. cytotoxické CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty. Diferencované buňky jsou schopny nejen cytokinové produkce, ale především také uvolňování serinových proteáz a perforinů, kterými jsou schopny narušit membránu cílové buňky a indukovat její osmolýzu (Havrdova 2001). Cytotoxické T-lymfocyty hrají důležitou roli v rejekci alloštěpu a protinádorové imunitě. V patogenezi RS se uplatňují přímým cytotoxickým vlivem na demyelinizovaná nervová vlákna a podporují tak irreverzibilní neurodegenerační procesy v CNS u tohoto onemocnění (Medana, Martinic et al. 2001).

Poměr CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů, tzv. imunoregulační index (IRI), byl mnoha autory měřen u pacientů s RS v periferní krvi i mozkomíšním moku (likvoru) v různých fázích onemocnění. Výsledky nejsou zcela konzistentní, taktéž samotný parametr IRI je dnes již opomíjen a některými autory považován za obsolentní, ale ve většině prací byl popsán zvýšený IRI v periferní krvi i likvoru pacientů s RS, a to zejména v období akutního vzplanutí choroby (Compston 1983; Bach, Martin et al. 1985; Ghezzi, Zaffaroni et al. 1986; Scolozzi, Boccafogli et al. 1992).

### 1.2.2. B-lymfocyty a plazmatické buňky – humorální odpověď specifické imunity

B-lymfocyty se u člověka vyvíjejí v časných embryonálních stádiích z fetální jaterní tkáně, později je zdrojem kostní dřev. První vývojové stadium progenitoru, tzv. pro-B lymfocytu, není ještě schopno produkovat protilátky (imunoglobuliny, Ig) a je charakterizováno povrchovými molekulami CD10 a CD19. V následujícím, tzv. pre-B stadiu, je již poprvé zaznamenána intracelulární produkce Ig. Tyto buňky se nacházejí pouze v kostní dřev. Teprve expresí povrchového imunoglobulinu třídy IgM se buňka stává nezralým B-lymfocytem, který lze již prokázat v periferní krvi, kudy se dostává do místa setkání s antigenem a maturace – do lymfoidních orgánů (lymfatické uzliny, slezina, Peyerovy plaky ve sliznici gastrointestinálního traktu). Zralý B-lymfocyt exprimuje povrchový B-buněčný receptor (BCR – komplex povrchového imunoglobulinu a signalizačních molekul). Základními markery jsou molekuly CD19 a CD20 (Abbas a Lichtman 2005). B-lymfocyty stimulované antigenem se za vhodných podmínek (především spolupráce s pomocnými Th-lymfocyty) pomnoží a diferencují se v konečné stadium, které představuje plazmatická buňka (plazmocyt). Plazmatická buňka secernuje imunoglobuliny extracelulárně a je hlavním producentem protilátek v lidském organismu. Plazmatické buňky neexprimují povrchové imunoglobuliny ani receptory pro komplement. Nenesou také typické B-lymfocytární markery CD19 a CD20, ale naopak exprimují molekuly CD38 a CD138 (Havrdova 2001; Abbas a Lichtman 2005).

Fyziologické funkce imunoglobulinů spočívají v neutralizaci toxinů, virů a dalších mikrorganismů, v opsonizaci (svou vazbou na mikroorganismy a jiné antigeny zlepšují protilátky proces antigenní prezentace a umožňují děj zvaný cytotoxická reakce závislá na protilátkách – ADCC) a v aktivaci komplementové kaskády (Hořejší a Bartůňková 2005).

Hlavní role v autoimunitním procesu u roztroušené sklerózy je tradičně přisuzována T-lymfocytům. Nicméně již přes 30 let je známa také přítomnost plazmatických buněk a B-lymfocytů v lézích CNS u RS (Prineas a Wright 1978; Esiri 1980; Baranzini, Jeong et al. 1999). Ve srovnání s nezánettivými chorobami CNS je u RS nalézán zvýšený počet B-lymfocytů a plazmatických buněk v mozkomíšním moku (Cepok, Jacobsen et al. 2001). Naproti tomu byl pozorován nižší počet B-lymfocytů v periferní krvi ve srovnání se zdravými kontrolami, což lze teoreticky vysvětlit přesunem těchto buněk do kompartmentu CNS u RS (Kreuzfelder, Shen et al. 1992). Neuropatologické studie prokázaly účast protilátek ve spolupráci s komplementem na demyelinizaci nervových vláken v zánětlivě aktivním ložisku RS (Storch, Piddlesden et al. 1998; Breij, Brink et al. 2008). Zároveň bylo poukázáno na roli specifické humorální imunity v udržování procesů v chronické fázi RS, kdy dochází spíše ke



kompartmentalizaci zánětu do tkání CNS za hematoencefalickou bariéru. Pro to svědčí nález aberantní lymfoidní tkáně – ektopických folikulů na meningách pacientů s RS (Magliozzi, Howell et al. 2007).

Předpokládané komplexní zapojení B-lymfocytů a plazmatických buněk do patogeneze RS lze shrnout do následujících dějů: antigenní prezentace T-lymfocytům, produkce myelin-specifických protilátek s destrukcí myelinu, cytokinová prozánětlivá produkce (Reindl, Kuenz et al.).

V souvislosti s lymfocytárními subpopulacemi je ve vztahu k autoimunitním onemocněním zmiňován ještě antigen CD5. Tento antigen je exprimován na subpopulaci B-lymfocytů (tzv. B1a-lymfocyty s dominující produkcí interleukinu IL-10) a dále na T-lymfocytech. Molekula CD5 hraje roli v inhibici aktivace TCR i BCR (Dalloul 2009). U zvířecích modelů autoimunitních onemocnění včetně EAE byla zvýšená exprese CD5 na B-lymfocytech a produkce IL-10 spojena s prevencí nebo mírnějším průběhem onemocnění (Fillatreau, Sweenie et al. 2002; Bouaziz, Yanaba et al. 2008). U vlastní RS je role CD5+ B-lymfocytů zatím ne zcela jednoznačná. Byly popsány zvýšené počty těchto buněk v mozkomíšním moku i periferní krvi u pacientů s RS (Mix, Olsson et al. 1990; Bongioanni, Fioretti et al. 1996). Zvýšené počty této lymfocytární subpopulace v periferní krvi dále korelovaly s aktivitou onemocnění (Seidi, Semra et al. 2002).

### **1.2.3. Monocyty, makrofágy, mikroglie**

Monocyty představují jednu z buněčných subpopulací, která se vyvíjí v myeloidní linii z kmenové buňky. Monocyty cirkulují v krvi a ve tkáních se dále diferencují na makrofágy. Mikroglie představují rezidenční makrofágy v CNS.

Hlavní fyziologickou funkcí monocytů/makrofágů je schopnost fagocytózy a prezentace antigenu buňkám specifické imunity. Monocyty/makrofágy jsou také producenty cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IL-10 a dalších. Jedná se o buňky hrající zásadní roli v zánětlivé reakci obecně.

Mikroglie tvoří asi 10-20% všech gliových buněk CNS a uplatňuje se všemi výše uvedenými efektorovými mechanismy (Gandhi, Laroni et al. 2010). Z hlediska EAE a RS bylo popsáno jak negativní prozánětlivé zapojení mikroglie v patogenezi (Kutzelnigg, Lucchinetti et al. 2005; Rasmussen, Wang et al. 2007), tak určitá prospěšná role těchto buněk. Mezi ně patří produkce protizánětlivých cytokinů IL-10 a transformujícího růstového faktoru beta (TGF- $\beta$ ) nebo sekrece neurotrofních faktorů (BDNF - Brain Derived Neurotrophic Factor, NT3

– Neurotrophin 3) (Gandhi, Laroni et al. 2010). Aktuální protizánětlivé či prozánětlivé zapojení mikroglie tak může být důležité pro průběh autoimunitního zánětu a neurodegenerace u RS (Weiner 2008).

#### **1.2.4. Natural killers (přirození zabíječi) – buněčná odpověď přirozené imunity**

Přirození zabíječi (natural killers, NK-buňky) jsou buňky podobné lymfocytům, nicméně neexprimují na svém povrchu antigenně specifické receptory a rozpoznávají především buňky s malou expresí molekul MHC I. třídy (např. nádorové buňky nebo některé virem infikované buňky). Funkčně jsou NK-buňky řazeny k přirozené imunitě organismu. Na svém povrchu nesou dva typy receptorů – inhibiční a stimulační. Inhibiční receptory rozpoznávají molekuly MHC I. třídy a strukturálně zahrnují lektinové a imunoglobulinové receptory (tzv. killer inhibitor receptor, KIR). Stimulační receptory představují některé adhezivní molekuly a Fc receptor (CD16). Kontakt NK-buňky s buňkou opsonizovanou imunoglobuliny třídy IgG je zprostředkován vazbou na molekulu CD16 a vede k agregaci receptorů a aktivaci cytotoxických mechanismů (perforiny, granzymy). Děj označujeme jako již zmíněnou, na protilátkách závislou buněčnou cytotoxicitu (ADCC). NK-buňky jsou také producenty cytokinů IFN- $\gamma$  a IL-3 a samy jsou aktivovány interferony alfa a beta (Hořejší a Bartůňková 2005).

Dalším povrchovým markerem NK-buněk je isoforma adhezivní molekuly NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule, CD56). 90% NK-buněk periferní krve tvoří buňky slabě exprimující CD56 a nesoucí molekulu CD16 (CD56<sup>dim</sup>CD16+). Mají převažující cytotoxickou funkci a produkce IFN- $\gamma$  je velmi malá. Ostatní buňky exprimující velké množství CD56 autoimunitního zánětu (Dalbeth, Gundle et al. 2004). Produkují velká kvanta cytokinů.

Z výsledků výzkumu EAE vyplynulo, že NK-buňky mohou mít limitující vliv na autoimunitní proces svým cytotoxickým působením na encefalitogenní T-lymfocyty (Zhang, Yamamura et al. 1997).

U pacientů s RS byl opakovaně popsán snížený počet a dysfunkce NK-buněk v periferní krvi oproti zdravým kontrolám (Lunemann, Tackenberg et al. 2011; Benczur, Petranyl et al. 1980; Kastrukoff, Morgan et al. 1998; De Jager, Rossin et al. 2008). I když některé práce naopak rozdíl v této subpopulaci u RS neprokázaly (Hauser, Ault et al. 1981; Santoli, Hall et al. 1981), lze o validitě těchto výsledků diskutovat (nedokonalá klasifikace NK-buněk, problém odlišení od NKT buněk atd.). NK-buňky navíc expandují v periferní krvi během účinné imunosupresivní a imunomodulační terapie (Bielekova, Catalfamo et al. 2006; Saraste, Irjala et al. 2007) a jejich počet koreloval s potlačením zánětu u RS na MR

(Bielekova, Catalfamo et al. 2006). Jsou proto považovány za důležitou buněčnou subpopulaci pro další výzkum RS.

Na tomto místě je potřeba zmínit ještě subpopulaci NK-T lymfocytů (NKT buněk). Jedná se o T-lymfocyty, které na svém povrchu exprimují molekuly NK-buněk (CD3+CD16+CD56+). Obdobně jako NK-buňky jsou také NKT-buňky zapojeny do regulačních dějů u autoimunitních onemocnění a rovněž byla u nich popsána porucha funkce a nedostatečné množství u RS (O'Keefe, Gately et al. 2008).

### 1.2.5. Cytokiny

Imunitní buňky mají různou schopnost sekrece solubilních proteinů nebo glykoproteinů, tzv. cytokinů, které jsou nástrojem chemické komunikace mezi buňkami. Cytokiny koordinují spolupráci přirozené a specifické imunity a rovněž imunity humorální a buněčné. Představují tkáňové hormony s pleiotropním účinkem, často v rámci složité cytokinové kaskády. Pro potřeby této práce byly vybrány cytokiny s nejjednoznačnějším vztahem k autoimunitnímu procesu, byť z výše uvedeného vyplývá, že každý cytokin svým zapojením může určitou roli v autoimunitním zánětu sehrát.

#### 1.2.5.1. Interferon gamma (IFN- $\gamma$ )

IFN- $\gamma$  je sekretován antigenně specifickými Th1 buňkami a NK-buňkami. Společně s interferony alfa a beta je účasten antivirové ochrany aktivací řady genů, navíc však posiluje také specifickou odpověď stimulací exprese MHC molekul I. i II. třídy a aktivací makrofágů a NK-buněk (Hořejší a Bartůňková 2005).

Přítomnost IFN- $\gamma$  byla prokázána v ložiscích RS v CNS (Traugott a Lebon 1988). Změny v cytokinové produkci byly pozorovány také v periferní krvi. Pokles počtu T-lymfocytů produkujících IFN- $\gamma$  a IL-4 předcházel aktivitě RS na MR, což lze vysvětlit možným přesunem těchto buněk do kompartmentu CNS při zánětlivé aktivitě onemocnění (Giovannoni, Silver et al. 2000). U aktivní, relabující RS byly popsány zvýšené hladiny IFN- $\gamma$  v periferní krvi (Frisullo, Nociti et al. 2008) a podání IFN- $\gamma$  pacientům s RS v rámci klinického pokusu vedlo k exacerbací onemocnění (Panitch, Hirsch et al. 1987).

### 1.2.5.2. Tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  je produkován stimulovanými monocyty/makrofágy, T-lymfocyty a B-lymfocyty, NK-buňkami, a dalšími buněčnými subpopulacemi. Účastní se zánětlivé reakce, kdy je produkován především v prvních dnech zánětu a je zodpovědný za recruitment leukocytů, aktivaci endoteliálních buněk, indukci angiogeneze a množení fibroblastů v rámci hojení rány. Hraje zásadní úlohu v septickém šoku. Indukcí apoptózy je dále schopen působit přímo cytotoxiicky např. na nádorové buňky.

Vzhledem k zapojení do zánětlivého procesu byl podle očekávání TNF- $\alpha$  prokázán také v lézích RS v CNS (Hofman, Hinton et al. 1989; Selmaj, Raine et al. 1991), navíc se schopností přímé destrukce myelinu (Selmaj, Raine et al. 1991; Selmaj, Raine et al. 1991). Exprese mRNA (messenger ribonukleové kyseliny) pro TNF- $\alpha$  koreluje s poškozením oligodendrocytů a mírou demyelinizace v lézích RS (Bitsch, Kuhlmann et al. 2000).

Rovněž v periferní krvi byla popsána korelace mezi vstupním počtem CD4+ lymfocytů produkujících TNF- $\alpha$  a vývojem ložiskového postižení v T2-váženém obraze na MR v průběhu tříletého sledování (Killestein, Kalkers et al. 2001). Korelace byla pozorována také mezi počtem gadolinium enhancujících ložisek na MR a hladinou TNF- $\alpha$  v periferní krvi  $> 50$  pg/ml (Spuler, Yousry et al. 1996).

Kontroverzní však byly výsledky klinického výzkumu použití anti-TNF terapie u RS. Zatímco blokáda TNF- $\alpha$  vedla k úspěšnému potlačení zvířecího modelu RS (Selmaj, Raine et al. 1991) a představuje účinnou terapii u jiných autoimunitních onemocnění, u samotné RS bylo podání protilátky proti TNF i rekombinantního solubilního TNF receptoru lenerceptu spojeno se zvýšenou aktivitou onemocnění (van Oosten, Barkhof et al. 1996; The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group 1999).

### 1.2.5.3. Interleukin-2 (IL-2)

IL-2 je glykoprotein produkováný zejména Th1-lymfocyty, který působí jako růstový faktor pro T-lymfocyty, B-lymfocyty a NK-buňky. IL-2 podporuje sekreci prozánětlivých cytokinů IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  a rozhoduje o síle imunitní odpovědi. Receptorem pro IL-2 je molekula CD25, která se skládá z řetězce alfa (který zvyšuje afinitu vazby, ale sám o sobě není schopen přenosu signálu) a z řetězců beta a gamma. Právě alelická varianta alfa řetězce (IL2RA) je spojena s vyšším relativním rizikem rozvoje RS dle genetických studií (Weber, Fontaine et al. 2008).

T-lymfocyty exprimující IL-2 nebo jeho receptor jsou přítomny v demyelinizačních lézích u aktivní RS (Hofman, von Hanwehr et al. 1986). Opakovaně byla popsána významná korelace mezi koncentrací IL-2 a jeho receptoru v séru a aktivitou onemocnění (Gallo, Piccinno et al. 1988; Adachi, Kumamoto et al. 1990; Sharief a Thompson 1993). Subkutánní podávání protilátky proti molekule CD25 (daclizumab) v kombinaci se standardní léčbou interferonem beta u pacientů s RS vedlo k signifikantnímu snížení počtu aktivních lézí na MR ve srovnání s léčbou samotným interferonem beta (Wynn, Kaufman et al.). Aktuálně probíhá již fáze III klinického hodnocení účinnosti daclizumabu u RS.

#### **1.2.5.4. Interleukin-4 (IL-4)**

IL-4 je produkován zejména Th2-lymfocyty a dále stimulovanými žírnými buňkami. Jedná se o cytokin typický pro Th2 imunitní odpověď, inhibující odpověď Th1 s tvorbou prozánětlivého IFN- $\gamma$ . IL-4 má funkci růstového faktoru pro B-lymfocyty a indukuje izotypový přesmyk imunoglobulinů na IgG4 a IgE.

Vzhledem k převaze Th2 imunitní odpovědi nad Th1 je IL-4 svým působením chápán spíše jako protizánětlivý cytokin v autoimunitním procesu (Havrdova 2001). Jeho preferenční výskyt především v chronických RS lézích vedl k hypotéze, že hraje roli ve formování chronických neakutních lézí (Hulshof, Montagne et al. 2002).

U EAE byl prokázán důležitý regulační vliv IL-4 na autoimunitní zánět díky ovlivnění fenotypu makrofágů a rezidenční mikroglie, které se tak mohou zapojit do reparačních tkáňových procesů (Ponomarev, Maresz et al. 2007).

Statisticky významný pokles IL-4 v periferní krvi koreloval s výskytem aktivních lézí na MR stejně jako hladina IFN- $\gamma$ , což lze obecně přisoudit účasti obou cytokinů na zánětlivém procesu za hematoencefalickou bariérou (Franciotta, Zardini et al. 2000; Killestein, Rep et al. 2001).

#### **1.2.5.5. Interleukin-10 (IL-10)**

IL-10 představuje stejně jako IL-4 cytokin Th2 imunitní odpovědi. Je produkován Th2-lymfocyty, monocyty/makrofágy a aktivovanými B-lymfocyty. Má inhibiční vliv na syntézu cytokinů Th1 buněk (především IFN- $\gamma$ ) a naopak potencuje diferenciaci B-lymfocytů na plazmatické buňky.

V CNS pacientů s RS byla prokázána přítomnost IL-10 shodně s IL-4 především v chronických lézích (Hulshof, Montagne et al. 2002).

V sekundárně progresivní fázi RS byla nalezena statisticky významná korelace mezi vysokou koncentrací IL-10 v periferní krvi a nízkým stupněm invalidity a nízkým počtem lézí v T2-váženém obraze na MR (Petereit, Pukrop et al. 2003).

Zajímavé výsledky přinesla recentní studie prokazující sníženou produkci IL-10 B-lymfocyty stimulovanými přes toll-like receptor 9 (TLR9) u pacientů s RS ve srovnání se zdravými kontrolami (Hirota, Niino et al.). To ukazuje na možnou dysregulaci interakcí přirozené a specifické imunity u RS.

#### **1.2.5.6. Interleukin-12 (IL-12)**

IL-12 je produkován antigen prezentujícími buňkami jako odpověď na stimulaci exogenním antigenem. Funguje synergisticky s IL-2 jako růstový faktor pro T-lymfocyty, B-lymfocyty a NK-buňky. Podporuje především Th1 imunitní odpověď s produkcí IFN- $\gamma$  a fyziologicky se uplatňuje v obraně organismu proti intracelulárním mikrobiálním patogenům.

V rámci autoimunitního procesu u EAE IL-12 stimuluje diferenciaci encefalitogenních T-lymfocytů, navíc podporuje jejich vstup do CNS zvýšením exprese adhezivních molekul včetně chemokinového receptoru CCR5 (Bagaeva, Williams et al. 2003; Deshpande, King et al. 2006). Podání anti-IL-12 preparátu u EAE vedlo k prevenci motorického postižení (Leonard, Waldburger et al. 1995).

Zvýšená hladina IL-12 v periferní krvi u pacientů s RS byla pozorována ve spojení s akutní exacerbací onemocnění (Clerici, Saresella et al. 2001) i s progresivní fází onemocnění (Filion, Matusevicius et al. 2003). Podání protilátky proti IL-12 (ustekinumab) však v rámci klinického výzkumu u RS nebylo efektivní a je diskutováno, zda je reálně vůbec možné léčebně postihnout samotný počátek onemocnění, kdy dochází zřejmě k hlavnímu uplatnění funkcí IL-12 (Longbrake a Racke 2009).

### **1.3. Roztroušená skleróza, klinicky izolovaný syndrom a neuromyelitis optica**

#### **1.3.1. Definice a diagnostická kritéria (roztroušená skleróza a klinicky izolovaný syndrom)**

##### **1.3.1.1. Relaps (ataka) a progrese onemocnění**

Ataka onemocnění je definována jako výskyt nových/znovu se objevivších neurologických příznaků nebo zhoršení stávajících příznaků, které trvá konstantně  $\geq 24$  hodin, a není vysvětlitelné zvýšením tělesné teploty. Příznaky, které se objeví do 30 dnů od počátku ataky, jsou hodnoceny jako jedna ataka. Samotný symptom únavy není hodnocen jako ataka (Compston 2006).

Progrese onemocnění je definována většinou autorů jako trvalé zhoršení neurologických příznaků trvající  $\geq 6$  měsíců (Schumacker, Beebe et al. 1965; Poser, Paty et al. 1983; Confavreux, Compston et al. 1992).

##### **1.3.1.2. Diagnóza klinicky izolovaný syndrom a roztroušená skleróza**

Diagnostická kritéria RS se postupně vyvíjela s cílem posunout stanovení diagnózy do nejčasnějšího stadia onemocnění v souladu se snahou o včasné zahájení účinné léčby. Základním principem zůstává diseminace zánětlivého procesu v prostoru a čase.

Schumacherova kritéria z 60. let minulého století byla postavena především na klinickém pozorování. Poserova kritéria z r. 1983 již implementovala první pomocná vyšetření (vyšetření mozkomíšního moku a evokovaných potenciálů) (Poser, Paty et al. 1983). McDonaldova kritéria z r. 2001, revidovaná v r. 2005 a naposledy v r. 2010, přinesla důraz na využití paraklinické metody – magnetické rezonance (MR), která umožnila dřívější stanovení diseminace v čase a dosažení diagnózy RS ještě před druhou klinickou příhodou (Polman, Reingold et al. 2011; McDonald, Compston et al. 2001; Polman, Reingold et al. 2005). Poslední revize McDonaldových kritérií z roku 2010 umožňuje stanovení diagnózy RS již na základně jediného MR vyšetření s průkazem lézí různého stáří s a bez gadolinium enhancementu (Polman, Reingold et al. 2011) – Tabulka č.1.

Průkaz diseminace v prostoru je definován přítomností alespoň 1 léze v T2-váženém MR obraze nejméně ve dvou ze čtyř oblastí CNS – periventrikulární, juxtakortikální, infratentoriální nebo míšní (Swanton, Rovira et al. 2007).

Průkaz diseminace v čase je definován a) novou lézí v T2-váženém MR obraze a/nebo gadolinium vychytávající lézí na další MR oproti prvnímu MR vyšetření; nebo b) současnou přítomností asymptomatických gadolinium vychytávajících lézí a nevychytávajících lézí na kterémkoliv MR (Montalban, Tintore et al. 2010).

Zároveň byla definována jednotka klinicky izolovaného syndromu (clinically isolated syndrome, CIS), jako první ataky suspektní z rozvoje RS dle typického klinického obrazu, nálezů na MR i v likvoru jako další pomocné laboratorní metody.



Tabulka č. 1: McDonaldova diagnostická kritéria, 2010 (Polman, Reingold et al.)

Klinický obraz a objektivní léze	Další údaje potřebné ke stanovení RS
$\geq 2$ relapsů onemocnění, klinické známky svědčící pro $\geq 2$ objektivní léze; nebo 1 objektivní léze s anamnestickým průkazem předchozího relapsu	Žádné
$\geq 2$ relapsů onemocnění, klinické známky svědčící pro 1 objektivní lézi	Diseminace v prostoru prokázaná: <ul style="list-style-type: none"> <li>• MR</li> </ul> <b><u>NEBO</u></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Druhá klinická ataka z jiné lokalizace CNS</li> </ul>
1 relaps onemocnění, klinické známky svědčící pro $\geq 2$ objektivní léze	Diseminace v čase prokázaná: <ul style="list-style-type: none"> <li>• MR</li> </ul> <b><u>NEBO</u></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Druhá klinická ataka</li> </ul>
1 relaps onemocnění, klinické známky svědčící pro 1 lézi (klinicky izolovaný syndrom, CIS)	Diseminace v prostoru prokázaná: <p>MR</p> <b><u>NEBO</u></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Druhá klinická ataka z jiné lokalizace CNS</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b><u>A</u></b></p> Diseminace v čase prokázaná: <ul style="list-style-type: none"> <li>• MR</li> </ul> <b><u>NEBO</u></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Druhá klinická ataka</li> </ul>
0 relapsů, progrese neurologického nálezu od počátku onemocnění	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 rok trvající progrese klinického nálezu</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b><u>A</u></b></p> Dvě ze tří kritérií: <ol style="list-style-type: none"> <li>a) Pozitivní MR mozku</li> <li>b) Pozitivní MR míchy</li> <li>c) Pozitivní CSF (likvor)</li> </ol>

### 1.3.1.3. Klinická symptomatika a hodnocení neurologického nálezu

Onemocnění může postihnout kteroukoliv dráhu centrálního nervového systému (mozku i míchy), proto také klinické příznaky mohou být velmi pestré. Mezi typické počáteční symptomy řadíme náhle vzniklou, nejčastěji monookulární poruchu zraku (zánět očního nervu, optická neuritis) nebo citlivostní symptomy (parestezie, hypestezie). Postižení motorických drah vede k centrálnímu typu parézy (mono-, para-, tri- i kvadraparéza). Mezi další příznaky patří postižení mozkového kmene a mozečku (pseudobulbární syndrom, vertigo, diplopie a nystagmus, porucha rovnováhy, ataxie, intenční tremor), postižení zadních provazců míšních se spinální ataxií, poruchy sfinkterů a sexuální dysfunkce. Časté jsou také poruchy nálady, především ve smyslu deprese, a symptom únavy. Může docházet i k postižení kognitivních funkcí (Havrdova 2001).

Standardní škálu k hodnocení neurologického nálezu u pacienta s RS představuje Kurtzkeho škála Expanded Disability Status Scale, EDSS (Kurtzke 1983). Hodnocen je funkční systém (FS) zrakový, kmenový, motorický, cerebelární, sensorický, sfinktery a cerebrální (nálada, kognice). Stupnice 0-10 je nelineární. Od 0 do 3,5 je EDSS skóre dáno součtem postižení jednotlivých FS, od stupně 4 včetně je hlavním údajem pro výsledné skóre maximální vzdálenost, kterou je schopen pacient bez či s pomůckami ujít. Přes tuto nedokonalost i nedostatečné zhodnocení postižení funkce horních končetin a kognice je škála EDSS nejpoužívanější škálou k hodnocení invalidity u RS – Tabulka č. 2.

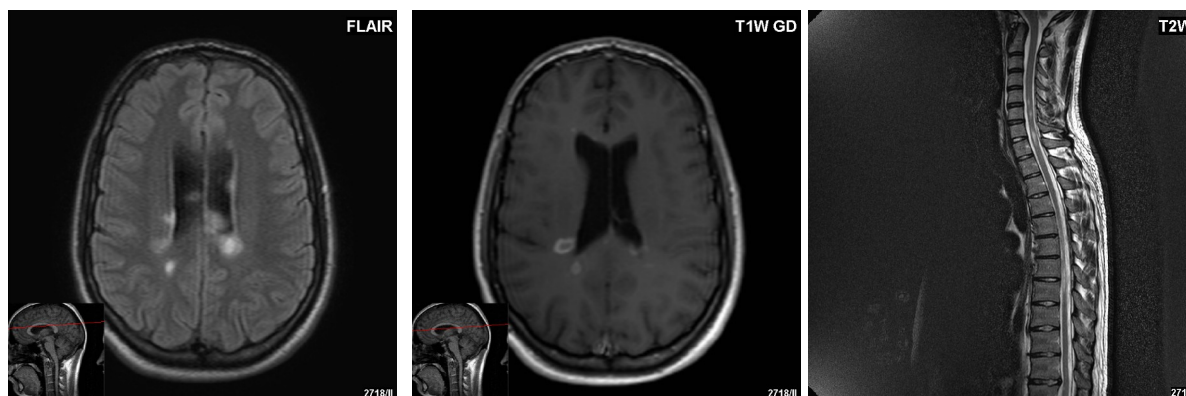
Tabulka č.2: Expanded Disability Status Scale (EDSS) dle Kurtzke et al. 1983 (Kurtzke 1983)

<b>0.0</b>	Normální neurologický nález
<b>1.0</b>	Bez postižení, minimální patologické známky v 1 FS
<b>1.5</b>	Bez postižení, minimální patologické známky ve > 1 FS
<b>2.0</b>	Minimální postižení v 1 FS
<b>2.5</b>	Lehké postižení v 1 FS nebo minimální postižení ve 2 FS
<b>3.0</b>	Středně závažné postižení v 1 FS, nebo lehké postižení ve 3-4 FS, ale stále plně hybný
<b>3.5</b>	Plně hybný, se středně závažným postižením v 1 FS a více než minimálním postižením v dalších FS
<b>4.0</b>	Plně hybný bez opory či pomoci, soběstačný, i při relativně významném deficitu, schopen chůze bez odpočinku a pomůcky kolem 500 m
<b>4.5</b>	Plně hybný bez opory či pomoci, soběstačný, schopen celodenní práce, aktivity jsou přesto již limitované, vyžaduje minimální asistenci. Výrazné postižení. Schopen chůze bez odpočinku a pomůcky kolem 300 m
<b>5.0</b>	Plně hybný, chůze bez odpočinku a pomůcky kolem 200 m, výrazné postižení limitující celodenní aktivity, schopen ale práce na plný úvazek
<b>5.5</b>	Hybný, chůze bez odpočinku a pomůcky kolem 100 m, výrazné postižení limitující celodenní aktivity
<b>6.0</b>	Intermitentní nebo jednostranná opora (hůl, berle) je nutná k chůzi kolem 100 m bez odpočinku či s odpočinkem
<b>6.5</b>	Stálá oboustranná opora (hůl, berle) je nutná k chůzi kolem 20 m bez odpočinku
<b>7.0</b>	Není schopen chůze delší než 5 metrů a to ani s dopomocí, pacient na vozíku. Přesuny z vozíku a transport vozíkem zvládá sám. Na vozíku tráví více než 12 hodin denně
<b>7.5</b>	Schopen chůze pouze několika kroků, odkázán na vozík. Přesuny z vozíku s dopomocí a transport vozíkem zvládá sám, ale ne celý den, stav může vyžadovat elektrický vozík
<b>8.0</b>	Odkázán na lůžko nebo vozík, ale zvládne být mimo lůžko většinu dne, částečně zachována soběstačnost, zachována funkce horních končetin.
<b>8.5</b>	Odkázán na lůžko většinu dne, částečně zachována funkce horních končetin a sebeobslužnost
<b>9.0</b>	Odkázán na lůžko, nesoběstačný, může komunikovat a jíst.
<b>9.5</b>	Zcela nesoběstačný pacient, upoután na lůžko, nekomunikuje, problémy s polykáním.
<b>10.0</b>	Smrt v důsledku RS

### 1.3.1.4. Magnetická rezonance

Magnetická rezonance (MR) představuje základní paraklinickou vyšetřovací metodu, která je využívána v diagnostice i ke sledování průběhu RS. Standardně využíváme konvenční techniky zobrazení v T2-váženém obraze, v T1-váženém obraze včetně podání kontrastní látky gadolinia a sekvenci FLAIR (fluid attenuated inversion recovery) s potlačením signálu mozkomíšního moku. Ložiska typická pro RS jsou vícečetná, hyperintenzní, lokalizovaná především v oblasti corpus callosum, juxtakortikálně, podél postranních komor (oválná ložiska kolmá na oblast postranních komor), v mozkovém kmeni a v oblasti míchy. Známkou aktivity ložiska a tím porušené hematoencefalické bariéry je syčení ložiska gadoliniem. Jak již bylo uvedeno, dosud poslední diagnostická kritéria z r. 2010 umožňují stanovit diagnózu RS již z prvního MR vyšetření u pacienta s typickými klinickými příznaky (Polman, Reingold et al. 2010). Samotný nález hyperintenzních ložisek na MR nicméně není specifický pouze pro RS a zvláště s přibývajícím věkem první manifestace onemocnění je zvážení jiné etiologie v rámci diferenciální diagnostiky velmi důležité.

Obr. č. 1.: Magnetická rezonance (mozek sekvence FLAIR a T1-vážený obraz s gadoliniem, mícha T2-vážený obraz) u 23-letého pacienta s nově diagnostikovanou RS



(zapůjčeno prof. MUDr. Seidlem, DrSc., Radiodiagnostická klinika VFN a 1. LF UK v Praze)

### 1.3.1.5. Vyšetření mozkomíšního moku (likvoru)

Vyšetření mozkomíšního moku (likvor, CSF – cerebrospinal fluid) považujeme za nedílnou součást paraklinických vyšetření u pacienta se suspekci na CIS/RS. Základní cytologický a biochemický nález může být sice zcela normální, častěji však nalézáme zvýšený počet lymfocytů (do 100/1  $\mu$ l), známky jejich aktivace, případně přítomnost lymfoplazmocytů až diferencovaných plazmatických buněk. Může být mírně zvýšená celková bílkovina.

Typické nálezy přináší až speciální biochemie, kdy nalézáme zvýšený IgG index, průkaznou intratekální syntézu IgG a především metodou izoelektrické fokusace stanovujeme oligoklonální pásy v alkalické části spektra pouze v likvoru bez korelátu v séru.

#### **1.3.1.6. Ostatní paraklinické metody**

Další vedlejší metody, které využíváme k podpoře diagnózy RS případně v rámci diferenciální diagnostiky, zahrnují evokované potenciály a optickou koherenční tomografii. V rámci evokovaných potenciálů využíváme především zrakové a somatosensorické potenciály, které mohou ukázat na demyelinizační/axonální postižení centrálního úseku příslušné dráhy. Optická koherenční tomografie umožňuje zhodnocení retinální vrstvy nervových vláken. Slouží tak nejen ke kvantifikaci axonálního postižení zrakového nervu po prodělané optické neuritidě, ale může být nástrojem k měření neurodegenerace u RS obecně (Galetta, Calabresi et al. 2011) a rovněž pomoci v rámci diferenciální diagnózy například vůči dalšímu autoimunitnímu onemocnění s postižením zrakových nervů, kterým je neuromyelitis optica (Ratchford, Quigg et al. 2009).

#### **1.3.2. Průběhy onemocnění**

U zhruba 85% pacientů se klinicky RS v první fázi projeví výskytem akutních relapsů následovaných různě dlouhým obdobím remise. Jedná se o relaps-remitentní formu RS (RR-RS). Jak již bylo zmíněno, první relaps suspektní z rozvoje RS dle klinických příznaků a nálezů na paraklinických metodách je pak označován jako klinicky izolovaný syndrom (CIS).

U přirozeného, léčbou neovlivněného průběhu RS byl popsán přechod RR-RS do následující fáze tzv. sekundárně progresivní RS (SP-RS) nejčastěji v horizontu 10-20 let od počátku onemocnění (Compston 2006). Klinicky ve fázi SP-RS již většinou nejsou přítomny relapsy a dominuje pozvolná progresie neurologické invalidity. Patofyziologicky v této fázi dochází k postupnému snížení aktivity zánětu v CNS a invalidita je převážně důsledkem ireverzibilní neurodegenerace CNS (Fisher, Lee et al. 2008). Veškeré imunosupresivní a imunomodulační postupy, které v léčbě RS máme v současné době k dispozici, jsou účinné především v zánětlivé RR-RS a jejich účinnost ve fázi SP-RS klesá. Důležitým cílem léčby RS je tedy mimo jiné oddálení léčebně málo ovlivnitelné fáze SP-RS.

U zhruba 10% pacientů onemocnění probíhá bez relapsů progresivně od samotného počátku – jedná se o tzv. primárně-progresivní RS (PP-RS). I zde předpokládáme větší

uplatnění neurodegenerace v patofyziologii onemocnění (Tallantyre, Bo et al. 2009), což dokládá také obecně malá účinnost protizánětlivých léků.

### 1.3.3. Prognóza onemocnění a prognostické markery

V současné době stále nemáme k dispozici kvalitní prognostické markery, které by jednoznačně ukázaly prognózu pacienta se stanovenou diagnózou RS. Neznalost prognózy znamená rovněž neschopnost zvolit odpovídající intenzitu léčebných postupů u individuálního pacienta, což může způsobit jak nedostatečnou léčbu na straně jedné, tak neadekvátní léčbu s převažujícími nežádoucími účinky na straně druhé.

Prognózu RS v rámci současné klinické praxe odhadujeme na základě dosavadních klinických zkušeností a několika málo ukazatelů, které již byly ve spojitosti s dalším vývojem RS popsány.

Z klinických ukazatelů se jedná především o prognosticky nevýhodný vyšší věk v době počátku nemoci, mužské pohlaví, charakter příznaků první ataky (sfinkterové, motorické a cerebelární obtíže) a polysymptomatický začátek, reziduum po prvním relapsu, krátký interval mezi relapsy a vyšší frekvence relapsů během prvních let onemocnění (Weinshenker, Bass et al. 1989; Confavreux, Vukusic et al. 2003; Bergamaschi 2006).

Z MR ukazatelů je prognosticky důležitá přítomnost a objem ložisek na vstupní MR při stanovení diagnózy. Negativní vstupní MR znamená riziko rozvoje CDMS 10-25%. Naproti tomu nález dvou a více lézí na vstupní MR již znamená riziko rozvoje CDMS v průběhu prvních tří let 60-80% (Tintore, Rovira et al. 2006; Fisniku, Brex et al. 2008). Větší objem ložisek na vstupní MR pak je zřejmě spojen s těžším průběhem onemocnění (Fisniku, Brex et al. 2008).

V běžné praxi zatím není využíván žádný genetický prognostický ukazatel. Genetické faktory jsou mnohem lépe prozkoumány a korelují s náchylností k RS jako takové (již zmíněné alely MHC II. třídy HLA-DRB1\*1501, IL2RA, IL7RA, a další), ale nebyly popsány v jednoznačné souvislosti se závažností průběhu onemocnění (Hensiek, Seaman et al. 2007), případně byly výsledky velmi heterogenní jako v případě alely apolipoproteinu E (apoE4) (Evangelou, Jackson et al. 1999; Fazekas, Strasser-Fuchs et al. 2001; Zwemmer, van Veen et al. 2004; Portaccio, Goretti et al. 2009).

Obdobně u RS zatím není k dispozici žádný obecný imunologický prognostický marker. Byla sice publikována například data o asociaci mezi aktivitou onemocnění a sérovou koncentrací protilátek proti myelinovému oligodendrocytárnímu glykoproteinu a

myelinovému bazickému proteinu (Berger, Rubner et al. 2003), ale výsledky nebyly průkazné na jiné pacientské populaci. Stejně tak zatím nebyla ověřena výtěžnost ani ostatních potencionálních imunologických markerů, které byly doporučeny k dalšímu výzkumu (Bielekova a Martin 2004), a některé z nichž již byly zmíněny výše u jednotlivých imunitních subpopulací a zánětlivých působků.

#### **1.3.4. Neuromyelitis optica (morbus Devic)**

Neuromyelitis optica (NMO) představuje vzácné autoimunitní onemocnění CNS s dominantním postižením optických nervů a míchy. Dlouho byla tato choroba považována za asijskou variantu RS. V posledním desetiletí však došlo zejména díky zlepšení diagnostiky a povědomí o tomto onemocnění k nárůstu počtu pacientů s prokázanou NMO také v Evropě u populace neasijského původu. Podle italské studie lze odhadovat, že v Evropě tvoří NMO zhruba 1,5% všech demyelinizačních onemocnění CNS a má asi 40x nižší prevalenci ve srovnání s RS (Bizzoco, Lolli et al. 2009).

Patofyziologicky se jedná o onemocnění charakterizované autoimunitním zánětem s důležitou úlohou protilátkové specifické imunity (B-lymfocyty, plazmatické buňky). Typická pro toto onemocnění je produkce protilátek třídy IgG proti antigenní struktuře vodního kanálu aquaporinu 4, lokalizovaného predilekčně v membránách gliových buněk astrocytů v oblastech optických nervů a míchy. In vitro byl prokázán na komplementu závislý cytotoxický vliv těchto NMO-IgG protilátek vůči astrocytům (Sabater, Giralt et al. 2009).

Klinicky se onemocnění vyznačuje relapsy zánětů očního nervu (optickou neuritidou), ve srovnání s RS častěji bilaterálně, s malou tendencí k úpravě a trvalým reziduem i přes adekvátní léčbu. Další typický relaps NMO představuje transversální myelitis s rozsáhlým ložiskovým postižením míchy (délka ložiska typicky přes tři segmenty). Onemocnění může být monofazické, ale častěji mívá relabující průběh. Obecně se vyznačuje rychlým nárůstem trvalé invalidity a méně příznivou prognózou ve srovnání s RS (Sellner, Boggild et al.).

Revidovaná diagnostická kritéria pro NMO byla publikována v r. 2006 (Wingerchuk, Lennon et al. 2006). Zahrnují dvě absolutní kritéria (optická neuritis a myelitis), která musí být podpořena ještě alespoň dvěma ze tří vedlejších kritérií podporujících diagnózu (normální nález na vstupní MR mozku, léze míchy na MR délky  $\geq 3$  segmentů, pozitivita NMO-IgG v krvi).

Obr. č. 2.: Magnetická rezonance (T2-vážený obraz) s NMO lézí krční míchy



(zapůjčeno prof. MUDr. Seidlem, DrSc., Radiodiagnostická klinika VFN a 1. LF UK v Praze)

### 1.3.5. Léčba

#### 1.3.5.1. Léčba akutní ataky (relapsu)

Základním standardem v léčbě ataky je podání methylprednisolonu do celkové dávky 3-5 gramů během 3-7 dnů (Sellebjerg, Barnes et al. 2005). Pokud není dosaženo dostatečného efektu léčbou methylprednisolonem, dále již dávku kortikoidu pro převažující nežádoucí účinky nezvyšujeme. V takovém případě lze jednorázově přidat cytostatikum cyklofosfamid v dávce 1 g intravenózně. Vzácněji indikujeme u těžké ataky sérii léčebných plazmaferéz nebo off-label intratekální aplikaci depotního methylprednisolonu (80 mg) v kombinaci s cytosin arabinosidem (v bezpečné dávce 50 mg).

V ložisku akutního zánětu, které je zodpovědné za neurologické symptomy při atace, může být nevratně poškozeno až 11 000 nervových vláken na 1 mm<sup>3</sup> (Trapp, Peterson et al. 1998). Proto považujeme ataku RS za akutní neurologický stav vyžadující včasnou léčbu, a to včetně méně závažných symptomů (např. poruch citlivosti).

Kortikoidy působí nespecificky protizánětlivými a imunosupresivními účinky prakticky na všechny imunitní buněčné subpopulace a jednotlivé mediátory zánětu (Havrdova 2001). Jsou dosud nezastupitelné v léčbě akutního relapsu, nicméně nejsou schopny snížit riziko další aktivity choroby ani oddálit progresivní fázi RS. Z tohoto důvodu je vedle léčby ataky stejně důležité zahájení dlouhodobé léčby.



### 1.3.5.2. Léčba klinicky izolovaného syndromu (CIS)

Na základě dosud provedených klinických studií prokázaly ve tří- až pětiletém sledování schopnost snížit riziko rozvoje definitivní RS o 30-50% oproti placebo tyto léky: interferon beta, glatiramer acetát a intravenózní imunoglobuliny (Achiron, Kishner et al. 2004; Kappos, Polman et al. 2006; Comi, Martinelli et al. 2009). Jednotlivé preparáty jsou stejné jako v léčbě samotné RS a budou zmíněny dále.

### 1.3.5.3. Léčba relaps-remitentní roztroušené sklerózy – souhrn

Léky první volby u RR-RS představují tzv. léky modifikující průběh choroby (disease modifying drugs, DMDs) – interferony beta a glatiramer acetát - s prokazatelnou schopností snížit počet a závažnost atak i progresi choroby na MR (The IFN $\beta$  Multiple Sclerosis Study Group 1993; Paty a Li 1993; Johnson, Brooks et al. 1995; Jacobs, Cookfair et al. 1996; PRISMS Study Group 1998; Simon, Jacobs et al. 1998).

Tabulka č. 3: Možnosti léčby relaps-remitentní roztroušené sklerózy (RR-RS)

	účinná látka	dávka	způsob aplikace	preparát
<b>Léčba ataky (relapsu)</b>	methyprednisolon	3-5 g/3-7 dní	i.v., p.o.	SoluMedrol
	cyklofosfamid	1 g	i.v.	Endoxan
	methyprednisolonacetát (+ cytosin arabinosid)	80 mg (+ 50 mg)	i.t.	DepoMedrol (+ Cytosar)
<b>Léky první volby (DMD)</b>		30 $\mu$ g	i.m. 1x týdně	Avonex*
	IFN-beta-1a	22 nebo 44 $\mu$ g	s.c. 3x týdně	Rebif 22/44*
	IFN-beta-1b	250 $\mu$ g	s.c. obden	Betaferon*, Extavia*
	glatiramer acetát	20 mg	s.c. denně	Copaxone*
<b>Léky druhé volby</b>	natalizumab**	300 mg	i.v. à 4 týdny	Tysabri
	fingolimod (FTY720) **	0,5 mg	p.o. 1x denně	Gilenya
<b>Léky třetí volby</b>	intravenózní imunoglobuliny	0,15-0,20 g/kg	i.v. à 4 týdny	Flebogamma, Kiovig, Gammagard, Octagam
	azathioprin	50-100 mg	p.o. denně	Imuran, Azaprine
	methotrexát	2,5 mg	p.o. 3x týdně	Methotrexate-Lachema
<b>Cytostatika</b>	cyklofosfamid	1 g	i.v. à 4-8 týdnů	Endoxan
	mitoxantron	20 mg	i.v. à 4 týdny (3 měs.)	Refador
	ASCT			

\* indikace také pro klinicky izolovaný syndrom (CIS) v České republice

\*\* indikace jako 1. volba u vysoce aktivní RS

i.v. - intravenózně

p.o. - perorálně

i.t. - intratekálně

i.m. - intramuskulárně

s.c. - subkutánně

DMD - disease modifying drugs

IFN- $\beta$  - interferon beta

ASCT – vysokodávkovaná imunoablace s podporou hematopoetických kmenových buněk

Léky tzv. druhé volby u RR-RS představuje monoklonální protilátka natalizumab a modulátor receptoru sfingosin 1-fosfátu (S1P) fingolimod (oba léky mohou být využity u vysoce aktivní RS taktéž jako první volba). Případnou další volbu léčby představují orální imunosupresiva (azathioprin, methotrexát), intravenózní imunoglobuliny a cytostatické režimy (cyklofosfamid, mitoxantron). Jako off-label léčbu lze využít u vysoce agresivní RS také léčbu vysokodávkovanou imunoablací s podporou hematopoetických kmenových buněk (autologous stem cells transplantation, ASCT) (Krasulová 2011).

Vzhledem k cílům této práce bude dále podrobněji zmíněna léčba interferonem beta, natalizumabem a ASCT.

#### 1.3.5.4. Interferon beta

Interferon beta (IFN- $\beta$ ) představuje antiproliferativní multifunkční cytokin, který patří do skupiny interferonů typu I společně s interferonem alfa (IFN- $\alpha$ ) a interferonem tau (narodil od představitele skupiny typu II – prozánětlivého IFN- $\gamma$ ). Fyziologicky IFN- $\beta$  interferuje s transkripcí virových nukleových kyselin a podporuje buněčnou imunitní reakci proti intracelulárním mikrobům. IFN- $\beta$  je v lidském organismu produkován řadou buněk – nejvíce fibroblasty a samozřejmě buňkami infikovanými virem v rámci antivirového parakrinního působení na okolní, ještě neinfikované buňky.

V léčbě RS využíváme komplexního imunomodulačního efektu IFN- $\beta$ : snížení aktivity i průniku autoagresivních T-lymfocytů do CNS, snížení produkce prozánětlivých cytokinů (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , aj.) a naopak zvýšení tvorby protizánětlivých cytokinů (IL-10, TGF- $\beta$ ), snížení exprese MHC proteinů II. třídy zásadních pro prezentaci antigenu CD4<sup>+</sup> lymfocytům, zlepšení funkce regulačních T-lymfocytů, usnadnění apoptózy aktivovaných T-lymfocytů, a dalších funkcí (Havrdova 2001).

Vlivy IFN- $\beta$  in vivo na základní imunitní subpopulace periferní krve nejsou podle dosavadních prací jednoznačné, byť může v průběhu léčby dojít k signifikantním změnám ve srovnání s nálezy před zahájením léčby (např. snížení počtu NK-buněk) (Mirowska, Skierski et al. 2003).

Aktuálně v klinické praxi využíváme v léčbě CIS a RR-RS rekombinantně vyráběné preparáty IFN- $\beta$ -1a (vytvářený savčími ovariálními buňkami čínského křečka) a IFN- $\beta$ -1b (vytvářený *Escherichia coli* s nutností záměny aminokyseliny serinu za cystein na pozici 17 k dosažení stabilizace neglykosylované molekuly).

Účinnost léčby standardně hodnotíme podle klinické a MR aktivity onemocnění. Po 12 měsících léčby dále vyšetřujeme hladinu neutralizačních protilátek proti IFN- $\beta$  v krvi a produkci proteinu MxA po podání IFN- $\beta$ , čímž lze také odhalit případnou neefektivitu léku. Bohužel takto ale nejsme kvalitně schopni stanovit neúčinnost léčby dříve než v horizontu 12 měsíců, což je z hlediska pokračujícího zánětlivého procesu v CNS nedostatečné.

#### 1.3.5.5. Natalizumab

Natalizumab je humanizovaná monoklonální protilátka, která je namířena proti adhezivní molekule  $\alpha 4\beta 1$  integrinu na povrchu lymfocytů. Po navázání na cílovou molekulu brání natalizumab interakci integrinu s molekulou VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) na endotelu cévy a tím i dostatečně pevnému přilnutí lymfocytu k cévní stěně, které je zásadní pro vstup buňky do místa zánětu (u RS do CNS). Výsledkem je markantní snížení počtu CD4<sup>+</sup> lymfocytů a imunoregulačního indexu v mozkomíšním moku na hodnoty odpovídající hodnotám pacientů infikovaných virem HIV (Human Immunodeficiency Virus) (Stuve, Marra et al. 2006).

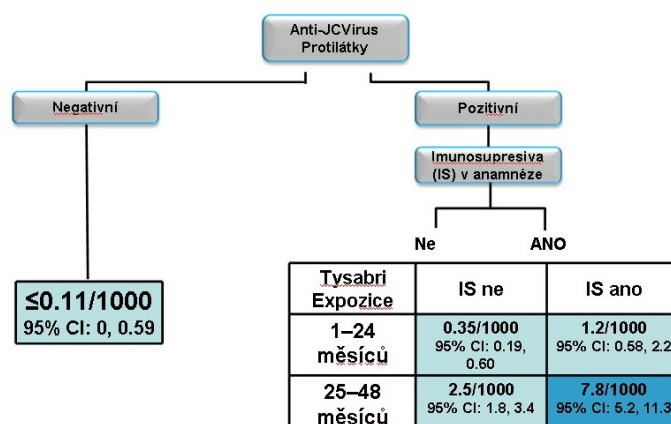
V periferní krvi byl většinou autorů popsán očekávaný zvýšený počet jednotlivých lymfocytárních subpopulací, které zde zůstávají po zablokování vstupu do CNS natalizumabem (Putzki, Baranwal et al. 2010; Krumbholz, Meinl et al. 2008; Kivisakk, Healy et al. 2009). Nejvíce se zvýšení týkalo B-buněčné linie (Putzki, Baranwal et al. 2010; Krumbholz, Meinl et al. 2008).

Zajímavý je také poznatek, že natalizumab mobilizuje kmenové hematopoetické CD34<sup>+</sup> buňky do periferní krve (Bonig, Wundes et al. 2008).

Výsledky klinické studie s natalizumabem prokázaly přibližně dvojnásobnou účinnost ve srovnání s dosavadními léky první volby (Havrdova, Galetta et al. 2009). V souvislosti s natalizumabem byl také poprvé představen koncept „disease-free“, tedy pacient bez

jakékoliv průkazné aktivity RS dle kliniky (bez atak a bez progresu neurologického nálezu) a MR (bez nových či aktivních lézí). Lék se tak rychle zařadil do léčebných schémat jako druhá volba pro aktivní RS, případně jako 1. volba u pacientů s vysoce aktivní RS a s rizikem časného rozvoje invalidity.

Zároveň s účinností lék s sebou nicméně přinesl také potenciální riziko závažné komplikace – virové oportunní infekce CNS, tzv. progresivní multifokální encefalopatie (PML). Riziko této komplikace jednoznačně souvisí s přítomností JC viru v organismu (cca 50-60% populace), s délkou podávání natalizumabu a předchozí imunosupresivní léčbou (Kappos, Bates et al. 2011).



Lege artis využití natalizumabu zahrnuje správnou a včasnou indikaci společně s pečlivým průběžným hodnocením efektu i možných rizik po celou dobu léčby.

### 1.3.5.6. Vysokodávkovaná imunoablace s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk

V případě agresivního průběhu RS s vysokou frekvencí relapsů a rychlou progresí neurologického deficitu, lze zvážit off-label léčbu vysokodávkovanou imunoablací s podporou krvetvorných kmenových buněk (ASCT – autologous stem cells transplantation).

Stejně jako všechny terapeutické postupy u RS i ASCT byla ve svém počátku založena na výsledcích preklinického výzkumu. Autologní (syngenní) transplantace kmenových buněk kostní dřeně dokázala zabránit rozvoji či léčit již indukovanou EAE. Závěry těchto experimentů ukázaly, že léčba ASCT je efektivní v počáteční fázi onemocnění, zatímco má malý či žádný efekt u zvířat léčených po delším trvání choroby – tento závěr je nyní po více než patnáctileté klinické zkušenosti obecně přijímán jako platný i v případě samotné RS (Ikehara, Good et al. 1985; Karussis, Slavin et al. 1992; Burt, Padilla et al. 1998).

Pilotní klinická studie fáze I/II s ASCT u pacientů s progresivní RS začala v řecké Soluni v r. 1995 (Fassas, Anagnostopoulos et al. 1997). Následovala další centra po celém světě včetně České republiky (Kozak, Havrdova et al. 2000). V letech 2002 a 2006 byly publikovány souhrnné výsledky z celoevropského registru EBMT – The European Group for Blood and Marrow Transplantation (Fassas, Passweg et al. 2002; Saccardi, Kozak et al. 2006), kde bylo zahrnuto 183 pacientů ze 45 center převážně s progresivní formou RS a průměrným stupněm EDSS 6,5. V rámci tříletého sledování bylo dosaženo intervalu bez progresu (progression-free survival, PFS) u 63% pacientů, což byl vynikající výsledek u skupiny pacientů s tímto stupněm postižení a progresí choroby minimálně o jeden stupeň škály EDSS v roce před ASCT. Následovaly práce, které ukázaly dlouhodobý vliv ASCT na stabilizaci RS (Mancardi a Saccardi 2008; Saiz, Blanco et al. 2008) a rovněž na snížení aktivity procesu na MR (Kozak, Havrdova et al. 2000; Mancardi, Saccardi et al. 2001; Saiz, Blanco et al. 2004).

Z hlediska bezpečnosti byla s výkonem spojená mortalita (treatment-related mortality, TRM) podle údajů EBMT z r. 2006 5,3% (Saccardi, Kozak et al. 2006), podle analýzy z r. 2008 2,3% (Fassas a Mancardi 2008).

Časné nežádoucí účinky v prvních 100 dnech po ASCT lze očekávat podle EBMT analýzy u 56% pacientů (febrilní neutropenie, sepse, infekce močových cest, gastroenteritis, mucositis, alergická reakce na antithymocytární globulin). Taktéž může dojít k přechodnému neurologickému zhoršení (17%). Pozdní nežádoucí příhody byly zaznamenány u 6% pacientů po 4.-41. měsíci od ASCT a zahrnovaly infekci varicella zoster virem, autoimunitní thyreoiditis a získanou autoimunitu s tvorbou protilátek proti koagulačnímu faktoru VIII.

Základní představa o efektu ASCT u autoimunitních onemocnění je založena na principu zničení imunitního systému včetně autoreaktivních klonů T-lymfocytů intenzivní cytostatickou léčbou s následnou rekonstitucí imunitního systému z vlastních kmenových buněk za jiných než původních ontogenetických podmínek (Havrdova 2001; Mancardi a Saccardi 2008). Je však známo, že klony T-lymfocytů rozpoznávající antigeny CNS (MBP) jsou po ASCT do jednoho roku opět vytvořeny (Sun, Popat et al. 2004), k obnově NK-buněk a B-lymfocytů dochází dokonce již do tří měsíců po ASCT (Burt, Cohen et al. 2003; Nash, Bowen et al. 2003). Důležitý je ovšem charakter subpopulací obnovovaných imunitních buněk: po dvou letech od ASCT (režim cyklofosfamid a celotělové ozáření) byla prokázána zvýšená tvorba naivních CD4+ lymfocytů původem z thymu na úkor nižšího zastoupení paměťových CD4+ lymfocytů. Zároveň byla průkazná větší receptorová diversita T-buněk ve srovnání s předtransplantačním vyšetřením (Muraro, Douek et al. 2005). V dospělém věku

obnovená thymopoéza z kmenových buněk tak může být zodpovědná za nastavení autotolerance po ASCT. Možným důkazem navození autotolerance po ASCT byla i normalizace počtu regulačních T-lymfocytů (CD4+, CD25+ a FoxP3+) po této léčbě u pacientů s autoimunitní juvenilní idiopatickou artritidou (de Kleer, Vastert et al. 2006).

Vedle hlavního imunologického principu účinnosti ASCT u RS stojí ještě úvaha o možném neuroregeneračním potenciálu kmenových hematopoetických buněk. U 4 pacientek, které dostaly v rámci heterologní transplantace kmenových buněk pro hematologická onemocnění hematopoetické kmenové buňky od dárců – mužů, byly postmortem nalezeny v CNS buňky obsahující Y chromosom. Tyto buňky byly tedy jednoznačně původem z dárcovských kmenových buněk a ukázaly schopnost diferenciaci kmenových buněk v buňky nervové (především v oblasti hipokampu a kůry mozkové) (Mezey, Key et al. 2003). Vedle toho však existují zprávy, které neurogenezi z hematopoetických kmenových buněk nepotvrdily (Castro, Jackson et al. 2002; Wagers, Sherwood et al. 2002), proto je efekt ASCT přičítán především intenzivní imunosupresi a obnově kvalitativně odlišného imunitního systému (Mancardi a Saccardi 2008).

Stejně jako u všech standardních postupů léčby RS ani u ASCT nebyl dosud definován jednoznačný ukazatel efektivity, který by umožnil správný výběr pacientů k této léčbě.

### **1.3.5.7. Léčba neuromyelitis optica**

Základní doporučení léčebných postupů u NMO jsou shrnuta v publikaci European Federation of Neurological Societies (EFNS) z r. 2010 (Sellner, Boggild et al. 2010).

V případě akutního relapsu je stejně jako u RS lékem volby methylprednisolon v celkové dávce 3-5 gramů. Při jeho nedostatečném efektu je v případě NMO jednoznačně doporučeno přistoupit k sérii plazmaferéz.

V dlouhodobé preventivní léčbě prokázaly svůj efekt a jsou doporučovány imunosupresivum azathioprin, monoklonální protilátka proti povrchovému znaku B-lymfocytů anti-CD20 - rituximab, cytostatika cyklofosfamid a mitoxantron (druhá volba), případně v další linii intravenózní imunoglobuliny (IVIG) a imunosupresiva methotrexát a mykofenolát mofetil. Doporučenou variantu léčby představuje také chronický plazmaferetický program.

Větší soubory pacientů s NMO, kteří by byli stejně jako pacienti s RS léčeni off-label autologní transplantací kmenových buněk zatím chybí. Publikovány byly pouze dvě

kazuistiky. V prvním případě došlo ke stabilizaci onemocnění dle klinického i MR vývoje po dobu dvanácti měsíců sledování od léčby ASCT (Peng, Qiu et al. 2010). Ve druhém případě byl ale popsán relaps onemocnění s transverzální míšní lézí již tři měsíce po provedení ASCT (Matiello, Pittock et al. 2011).

#### **1.3.5.8. Allogenní transplantace kmenových buněk u autoimunitních onemocnění**

Ještě vyšší účinnost v léčbě agresivních autoimunitních chorob ve srovnání s ASCT lze teoreticky očekávat u allogenní (heterologní) transplantace (alloSCT) kmenových buněk od cizího dárce. V tomto případě se jedná o transplantaci kmenových buněk dárce bez autoimunitního potenciálu, kdy lze navíc počítat také s příznivým vlivem reakce štěpu proti autoimunitě (Van Wijmeersch, Sprangers et al. 2007). Vliv alloSCT na autoimunitní onemocnění v humánní medicíně včetně RS byl nejprve popsán pouze na jednotlivých kazuistikách pacientů se současnou hematoonkologickou diagnózou, pro kterou bylo nutno přistoupit k alloSCT. V některých pracech bylo dosaženo velmi dobrého efektu na stabilizaci relaps-remitentní či progresivní formy RS (McAllister, Beatty et al. 1997; Mandalfino, Rice et al. 2000; La Nasa, Littera et al. 2004). Naproti tomu však byly publikovány také kazuistiky autoimunitních onemocnění, u kterých i po alloSCT léčbě z hematologické indikace přetrvávala aktivita základního onemocnění (Braendstrup, Langkilde et al. 2012; Jeffery 2007; Lu, Storek et al. 2009), a to i přes dosažení 100% chimerismu (Tapprich, Fenk et al. 2003). V případě Evansova syndromu taktéž autoimunitní etiologie došlo dokonce k fatálnímu relapsu pět let po alloSCT (Marmont, Gualandi et al. 2006).

Zásadní limit k provedení kvalitní studie s cílem zjistit efekt léčby alloSCT u RS a jiných autoimunitních onemocnění představuje z oboru hematologie známá rizikovost léčby a vysoká mortalita spojená s tímto typem léčby, která podle typu a stádia hematoonkologického onemocnění a zvoleného přípravného režimu dosahuje 5-45% (Copelan 2006). Léčba alloSCT pro samotné autoimunitní onemocnění je zatím proto zcela off-label postupem, který byl použit pouze ojediněle u jednotlivých pacientů s vysoce agresivním průběhem autoimunitního onemocnění. V rámci registru EBMT byla retrospektivně zpracována data souboru 35 pacientů s autoimunitními chorobami, kteří byli z důvodů této samotné diagnózy léčeni alloSCT (Daikeler, Hugle et al. 2009). Byť se jednalo o heterogenní soubor pacientů, celkově byl efekt léčby alloSCT u refrakterních autoimunitních chorob zhodnocen velmi pozitivně (alespoň částečné remise bylo dosaženo u 78% pacientů na 70,7 měsíců (medián)), nicméně mortalita spojená s léčbou alloSCT dosáhla v tomto souboru 20%. V uvedeném souboru byli

zařazení dva pacienti s neurologickým autoimunitním onemocněním (RS), kdy v obou případech došlo po alloSCT ke stabilizaci onemocnění (dosažená délka sledování byla 55,1 a 19,3 měsíců). Krátce je zmíněn další soubor 29 pacientů s autoimunitními chorobami léčenými alloSCT také v publikaci z amerického kontinentu Pasquiniho et al. (Pasquini, Voltarelli et al. 2012), kde dosáhla mortalita spojená s výkonem výše 37,9%, nicméně zde nebyl zařazen ani jeden pacient s primárně neurologickou diagnózou.

Dosud nebyla publikována žádná data o provedení alloSCT u pacienta s NMO. K dispozici je pouze šestiměsíční sledování pacienta s agresivním průběhem NMO, který byl v italském centru léčen alloSCT po předchozím selhání léčby pomocí ASCT. V tomto případě došlo ke zlepšení EDSS a stabilizaci onemocnění ve srovnání s vysokou zánětlivou aktivitou před alloSCT (osobní komunikace, Dr. Raffaella Greco, San Raffaele Scientific Institute, Hematology and Bone Marrow Transplantation Unit, Milano Italy).

#### **1.3.5.9. Léčba progresivních forem roztroušené sklerózy – souhrn**

U SP-RS i PP-RS je předpokládána jako hlavní příčina invalidity především neurodegenerace, zbytkový zánět se podílí mnohem méně. Efekt protizánětlivé terapie je proto menší ve srovnání s RR-RS a navíc velmi individuální. Optimální interval ke zhodnocení progresu a tím efektu léčby je 6 měsíců. Pokud po této době nedojde ke stabilizaci stavu, není na místě pokračovat ve zvolené terapii pro rizika převažujících nežádoucích účinků.

Z terapeutických přístupů byl popsán u SP-RS určitý efekt interferonu beta, ovšem zdaleka ne tak velký jako u RR-RS a především na počátku přechodu do SP-RS ještě v přítomnosti relapsů. Z cytostatických režimů využíváme pulzy cyklofosfamidu a mitoxantronu, z orálních imunosupresiv azathioprin nebo methotrexát. V případě kontraindikace nebo neúčinnosti imunosuprese je možno vyzkoušet intravenózní imunoglobuliny. Určitý efekt na stabilizaci progresu může mít také režim pulzního podávání methylprednisolonu (Havrdova 2001).

Samozřejmostí ve všech stádiích RS je využití symptomatické léčby k ovlivnění obtěžujících příznaků spasticity, sfinkterových a sexuálních dysfunkcí, psychických poruch (deprese, úzkost), neuropatické a neuralgické bolesti, třesu, únavy a dalších.



## 2. CÍLE PRÁCE

1. podrobně retrospektivně definovat skupinu pacientů s agresivní roztroušenou sklerózou, kteří byli v Centru pro demyelinizační onemocnění Neurologické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze léčeni vysokodávkovanou imunoablací s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk v letech 1998-2008 s cílem nalézt klinické ukazatele budoucí odpovědi na tuto léčbu a zpřesnit indikaci k této léčbě

2. popsat efekt a bezpečnost allogenní transplantace kmenových buněk na případech dvou pacientek s autoimunitním onemocněním CNS (roztroušená skleróza a neuromyelitis optica)

3. prospektivně sledovat vývoj jednotlivých lymfocytárních subpopulací a produkci intracelulárních cytokinů v periferní krvi u tří skupin pacientů:

A) pacientů s klinicky izolovaným syndromem léčených interferonem beta

B) pacientů s relaps-remitentní roztroušenou sklerózou léčených natalizumabem

C) pacientů s agresivní roztroušenou sklerózou léčených vysokodávkovanou imunoablací s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk

4. korelovat jednotlivé lymfocytární subpopulace a produkci intracelulárních cytokinů v periferní krvi pacientů všech tří skupin před zahájením a v průběhu léčby s klinickou aktivitou onemocnění vyjádřenou počtem atak a progresí neurologické invalidity (parametr EDSS) s cílem najít společný imunologický prognostický ukazatel aktivity onemocnění

### 3. PACIENTI A METODY

Všichni pacienti zařazení do sledování v rámci této práce jsou v péči Centra pro demyelinizační onemocnění Neurologické kliniky 1.LF UK a VFN v Praze. Pacienti byli o výzkumu podrobně informováni a podepsali informovaný souhlas.

#### 3.1. Pacienti s klinicky izolovaným syndromem léčení interferonem beta

Skupina pacientů s klinicky izolovaným syndromem (CIS) zahrnovala celkem 33 pacientů. Průměrný věk při CIS byl 31 let ( $\pm 8,1$  roku, median 29), poměr ženy/muži činil 22/11, průměrný stupeň EDSS při CIS byl 3,0 ( $\pm 1$ , median 4). Diagnóza CIS byla u všech pacientů potvrzena na základě typické klinické symptomatiky, nálezů na MR a positivity oligoklonálních pářů v mozkomíšním moku v akreditované laboratoři (obě vyšetření provedena před podáním kortikosteroidů).

Schéma sledování pacienta zahrnovalo následující časovou posloupnost:

1. vyšetření obvodním neurologem při objevení se prvních příznaků, vyslovení suspekce na první ataku demyelinizačního onemocnění, provedení vstupní MR
2. odeslání pacienta s typickými klinickými příznaky pro CIS a nálezem dvou a více 2 hyperintenzních ložisek na MR (T2-vážený obraz nebo sekvence FLAIR) do Centra pro demyelinizační onemocnění Neurologické kliniky 1. LF UK a VFN ke vstupní návštěvě
3. vstupní návštěva (tzv. screening) - zhodnocení neurologického nálezu (EDSS), provedení odběrů periferní krve a mozkomíšního moku k analýze včetně imunologických parametrů. Po uvedených vyšetřeních standardní léčba ataky methylprednisolonem v dávce 3-5 gramů
4. zařazovací návštěva (tzv. baseline) – alespoň 28 dnů od poslední dávky methylprednisolonu a zároveň nejdéle čtyři měsíce od počátku příznaků CIS. Vyhodnocení EDSS, odběr periferní krve k imunologické analýze, poté zahájení dlouhodobé léčby interferonem beta-1a 30  $\mu$ g intramuskulárně jedenkrát týdně (Avonex®)
5. další návštěvy s vyhodnocením EDSS, počtu atak, dlouhodobé léčby a s odběrem periferní krve k imunologickému vyšetření byly provedeny v měsících 6, 12, a 24 od zařazovací návštěvy do studie.

Hodnocení neurologického nálezu podle škály EDSS prováděl vždy tentýž neurolog u konkrétního pacienta. Progrese neurologického nálezu a počet atak byl určován podle definic uvedených v kapitole 1.3.1.1. Za potvrzenou progresi neurologického nálezu bylo přitom považováno zhoršení o  $\geq 1$  stupeň na škále EDSS (při EDSS  $< 5$ ) nebo zhoršení o  $\geq 0,5$  stupně na škále EDSS (při EDSS  $\geq 5$ ) trvající konstantně alespoň 6 měsíců. Toto klinické hodnocení společně s imunologickými parametry periferní krve (viz dále) bylo vyhodnoceno v rámci návštěv: screening (před kortikosteroidy, léčebně zcela naivní pacient), zařazovací návštěva (před IFN- $\beta$ ), 6. a 12. měsíc po zařazovací návštěvě. Do analýzy byly zahrnuty pouze vzorky krve odebrané alespoň 28 dnů od poslední dávky methylprednisolonu v rámci léčby případné ataky.

V průběhu sledovaného období 24 měsíců došlo ke změně dlouhodobé terapie celkem u 7 pacientů. Jednalo se o přidání azathioprinu v dávce 50 mg denně ke stávající léčbě IFN- $\beta$  u 2 pacientů a změnu podávaného preparátu Avonex® na interferon beta-1a 44  $\mu$ g subkutánně třikrát týdně (Rebif®) u 5 pacientů. Průměrná doba do změny terapie byla 12 měsíců od zařazovací návštěvy ( $\pm 3,4$  měsíců, median 12 měsíců). Vzhledem k tomu, že u všech 7 pacientů zůstal IFN- $\beta$  jako hlavní účinná látka v dlouhodobé terapii RS, byli tito pacienti a jejich vzorky zahrnuty do analýzy.

### **3.2. Pacienti s roztroušenou sklerózou léčení natalizumabem**

Druhou sledovanou skupinu tvořili pacienti s potvrzenou diagnózou relaps-remitentní roztroušené sklerózy (RR-RS) dle McDonaldových kritérií (Polman, Reingold et al. 2005) léčení monoklonální protilátkou natalizumabem (Tysabri®) v dávce 300 mg intravenózně v intervalu 4 týdnů.

Do této skupiny bylo zařazeno celkem 17 pacientů. Průměrný věk při zahájení terapie natalizumabem byl 33 let ( $\pm 9,2$  roku, median 28), poměr ženy/muži činil 9/8, průměrný stupeň EDSS při zahájení terapie byl 3,5 ( $\pm 1$ , median 4) a délka trvání RS 10 let ( $\pm 5$  let, median 8,5 let).

Hodnocení neurologického nálezu podle škály EDSS prováděl vždy stejný neurolog u celé skupiny pacientů. Progrese neurologického nálezu a počet atak byl určován dle definic uvedených v kapitole 1.3.1.1. Progrese neurologického nálezu a počet atak byl určován podle definic uvedených v kapitole 1.3.1.1. Za potvrzenou progresi neurologického nálezu bylo přitom považováno zhoršení o  $\geq 1$  stupeň na škále EDSS (při EDSS  $< 5$ ) nebo zhoršení o  $\geq$

0,5 stupně na škále EDSS (při  $EDSS \geq 5$ ) trvající konstantně alespoň 6 měsíců. Toto klinické hodnocení společně s imunologickými parametry periferní krve (viz dále) bylo vyhodnoceno v rámci návštěv: před zahájením léčby natalizumabem (0-28 dní před podáním první dávky), ve 3., 6., 12. a 24. měsíci léčby. Do analýzy byly zahrnuty pouze vzorky krve odebrané alespoň 28 dnů od poslední dávky methylprednisolonu v rámci léčby případné ataky.

V průběhu sledovaného období 24 měsíců byla léčba natalizumabem předčasně ukončena u 4 pacientů. Z toho u 3 pacientů pro neefektivitu (do 6 měsíců od zahájení léčby) a u jednoho pacienta na jeho vlastní přání (12 měsíců od zahájení léčby). Po ukončení léčby natalizumabem již nebyla další klinická ani imunologická data těchto pacientů do analýzy skupiny zahrnuta.

### **3.3. Pacienti s roztroušenou sklerózou léčení vysokodávkovanou imunoabací s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk (ASCT)**

Třetí sledovanou skupinu tvořili pacienti s diagnózou roztroušené sklerózy léčení vysokodávkovanou imunoabací s následnou podporou autologních hematopoetických kmenových buněk (ASCT). V rámci této práce byla zpracována:

A) prospektivně klinická a imunologická data skupiny 14 pacientů léčených ASCT v letech 2006-2010, kteří představují kontrolní skupinu ke skupinám pacientů s CIS léčených IFN- $\beta$  a pacientů s RS léčených natalizumabem

B) retrospektivně klinická data celé skupiny 26 pacientů s RS léčených ASCT v letech 1998-2008

Před zahájením samotné léčby ASCT byli všichni pacienti podrobně informováni o možném účinku i rizicích léčby a byl podepsán informovaný souhlas s tímto off-label léčebným postupem. Léčba ASCT sestávala u obou skupin z těchto fází:

1. priming – vyplavení (mobilizace) kmenových CD34+ buněk z kostní dřeně do periferní krve pomocí cyklofosfamidu (v dávce 2-4 g/m<sup>2</sup>) s následným subkutánním podáváním faktoru stimulujícího granulocytární kolonie G-CSF filgrastimu (v dávce 5-10  $\mu$ g/kg/den) do dosažení potřebného počtu kmenových buněk. Kmenové buňky jsou z periferní krve sbírány

leukaferézou. Za minimální, ještě dostačující počet získaných kmenových buněk v případě autoimunitních onemocnění je považována hodnota  $3 \times 10^6$  CD34+ buněk/kg.

2. případné zpracování štěpu (ex vivo = in vitro purging pomocí pozitivní selekce CD34+ nebo negativní selekce T-lymfocytů) a zamražení kmenových buněk v tekutém dusíku ( $-196^\circ\text{C}$ ).

3. conditioning (alespoň 3 týdny po primingu) – chemoterapeutický režim tzv. BEAM (BCNU=carmustin  $300\text{ mg/m}^2$  v den -6, etoposid  $200\text{ mg/m}^2$  a cytosin arabinosid  $200\text{ mg/m}^2$  ve dnech -5 až -2, melfalan  $140\text{ mg/m}^2$  v den -1), představující středně-intenzivní režim s lymfoablativním a silně myelotoxickým (ale nikoli zcela myeloablativním) účinkem.

4. vrácení kmenových buněk do krevního oběhu pacienta, tzv. převod (den 0).

5. podání antithymocytárního globulinu (ATG) v dávce  $4\text{ mg/kg}$  s cílem odstranit potencionálně se štěpem vrácené autoreaktivní T-lymfocyty (tzv. in vivo purging).

6. důležitou součástí celého léčebného procesu a především následujícího období po léčbě byla cílená fyzioterapie.

### **3.3.1. Prospektivně sledovaná skupina pacientů léčených ASCT**

Do této skupiny bylo zařazeno celkem 14 pacientů s diagnózou RS potvrzenou dle McDonaldových kritérií (Polman, Reingold et al. 2005). Průměrný věk při ASCT byl 31 let ( $\pm 5,9$  roku, median 33), poměr ženy/muži činil 7/7, průměrný stupeň EDSS při terapii ASCT byl 4,5 ( $\pm 1$ , median 4) a délka trvání RS 6 let ( $\pm 2,4$  let, median 5 let). Základní charakteristiky všech tří sledovaných skupin pacientů jsou pro přehled zobrazeny v Tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Základní charakteristiky sledovaných skupin pacientů

	<b>CIS - interferon beta</b>	<b>RS - natalizumab</b>	<b>RS - ASCT</b>
Počet pacientů	33	17	14
Poměr ženy:muži	22:11	9:8	7:7
Průměrný věk při zahájení léčby/CIS v letech (median)	31 (29)	33 (28)	31 (188)
Průměrná délka trvání RS při zahájení léčby v letech (median)	-	10 (8,5)	6 (5)
Průměrný stupeň EDSS při zahájení léčby/CIS (median)	3,0 (4,0)	3,5 (4,0)	4,5 (4,0)
Počet pacientů se změnou léčby v průběhu 24-měsíčního sledování	7	4	4
Počet pacientů vyřazených v průběhu 24-měsíčního sledování	0	4	0

CIS – klinicky izolovaný syndrom      ASCT – imunoablace s podporou autologních kmenových buněk  
 RS – roztroušená skleróza              EDSS – Expanded Disability Status Scale

Hodnocení neurologického nálezu podle škály EDSS prováděl vždy stejný neurolog u celé skupiny pacientů. Progrese neurologického nálezu a počet atak byl určován dle definic uvedených v kapitole 1.3.1.1. Progrese neurologického nálezu a počet atak byl určován podle definic uvedených v kapitole 1.3.1.1. Za potvrzenou progresi neurologického nálezu bylo přitom považováno zhoršení o  $\geq 1$  stupeň na škále EDSS (při EDSS < 5) nebo zhoršení o  $\geq 0,5$  stupně na škále EDSS (při EDSS  $\geq 5$ ) trvající konstantně alespoň 6 měsíců. Toto klinické hodnocení včetně vyhodnocování nežádoucích účinků léčby a imunologických parametrů periferní krve (viz dále) probíhalo v rámci návštěv: před zahájením první fáze ASCT (1,5-6 měsíců před dnem 0), ve 3., 6., 12. a 24. měsíci ode dne 0. Do analýzy byly zahrnuty pouze vzorky krve odebrané alespoň 28 dnů od poslední dávky methylprednisolonu v rámci léčby případné ataky.

Po ASCT byla zahájena dlouhodobá preventivní léčba RS celkem u 13 pacientů průměrně v intervalu prvních čtyř měsíců ode dne 0. Jednalo se o léčbu glatiramer acetátem (n=9) nebo intravenózními imunoglobuliny (n=4). V průběhu sledovaného období 24 měsíců došlo ke změně této dlouhodobé terapie celkem u 4 pacientů v průměrném intervalu 19 měsíců ode dne 0 (ve třech případech z důvodu aktivity onemocnění, v jednom případě z důvodu alergické reakce na glatiramer acetát). Všechny změny terapie byly v rámci léků

první volby respektive intravenózních imunoglobulinů, kde nepředpokládáme vzhledem k mechanismu účinků zásadní vliv na rekonstituci imunitních subpopulací po ASCT, proto byli pacienti i nadále zařazeni do sledování a analýz.

### 3.3.2. Retrospektivně sledovaná skupina pacientů léčených ASCT v letech 1998-2008

Do této skupiny bylo zahrnuto celkem 26 pacientů s diagnózou RS dle Poserových kritérií (Poser, Paty et al. 1983), kteří byli léčeni metodou ASCT v období od února 1998 do července 2008. Podle typu průběhu RS se jednalo o 11 pacientů s RR-RS a 15 pacientů se SP-RS. Poměr ženy/muži činil 15/11, průměrný věk při ASCT byl 32 let (median 33), průměrná délka trvání RS při ASCT 8 let (median 7) a průměrná délka trvání progresivní fáze RS u SP-RS pacientů činila 3 roky (median 3). Průměrný počet atak v roce předcházejícím ASCT u pacientů s RR-RS byl 2 (median 2). Průměrný stupeň EDSS při ASCT byl 5,5 (median 6).

Tabulka č. 5: Základní charakteristiky pacientů léčených ASCT v letech 1998-2008

	Celá skupina	RR-RS	SP-RS
Počet pacientů	26	11 (42%)	15 (58%)
Poměr ženy:muži	15:11	6:5	9:6
Věk při ASCT v letech (median)	32 (188)	28 (27)	35 (35)
Délka trvání RS při ASCT v letech (median)	8 (7)	5 (4)	10 (189)
Délka trvání progresivní fáze u SP-RS	3 (3)	-	3 (3)
Stupeň EDSS při ASCT - průměr (median)	5,5 (6,0)	4,5 (4,5)	6,5 (6,5)
In vitro čištění štěpu	7 (27%)	3 (27%)	10 (67%)
Podání ATG (in vivo purging)	16 (62%)	9 (82%)	6 (40%)
Dvojitě čištění štěpu (in vitro + ATG)	2 (8%)	1	1
Průměrná délka sledování při analýze dat v měsících (median)	69 (66)	43 (19)	89 (96)

RR-RS – relaps-remitentní roztroušená skleróza

SP-RS – sekundárně-progresivní roztroušená skleróza

ASCT – vysokodávkovaná imunoablace s podporou autologních kmenových buněk

EDSS – Expanded Disability Status Scale

ATG – antithymocytární globulin

Pacienti byli vyšetřováni před léčbou ASCT a poté pravidelně v intervalu šesti měsíců po léčbě ASCT až do června 2009. Hodnocení zahrnovalo stupeň EDSS, počet atak, dlouhodobou léčbu po ASCT a nežádoucí účinky. Progrese neurologického nálezu a počet atak byl určován dle definic uvedených v kapitole 1.3.1.1. Za potvrzenou progresi neurologického nálezu bylo přitom považováno zhoršení o  $\geq 1$  stupeň na škále EDSS (při EDSS < 5) nebo zhoršení o  $\geq 0,5$  stupně na škále EDSS (při EDSS  $\geq 5$ ) trvající konstantně alespoň 6 měsíců. Časné nežádoucí účinky byly definovány jako nežádoucí účinky, které se vyskytly v prvních 100 dnech po ASCT (po dni 0). Všechny ostatní nežádoucí účinky, které se objevily po více než 100 dnech od ASCT, představovaly pozdní nežádoucí účinky. Úmrtí spojené s transplantací (TRM – transplant related mortality) je definováno jako jakékoliv úmrtí, které nastává v období prvních 100 dnů po ASCT (Fassas, Passweg et al. 2002; Saccardi, Kozak et al. 2006).

### **3.4. Allogenní transplantace kmenových buněk v léčbě autoimunitních onemocnění – kazuistika RS a NMO**

#### **3.4.1. Kazuistika pacientky se sekundárně progresivní RS léčené alloSCT pro diagnózu myelodysplastického syndromu**

58-letá pacientka s RS verifikovanou dle McDonaldových kritérií. První akutní příznaky onemocnění RS vznikly v r. 1988 (ve 34 letech věku) a zahrnovaly vertigo a instabilitu se spontánní úpravou z relapsu. Další ataka se stejnými symptomy proběhla v r. 1990, obvodním neurologem byla zahájena léčba nízkou dávkou kortikosteroidu orálně (prednisolon 10 mg denně). Diagnóza RS byla definitivně stanovena v r. 1992, kdy byla v objektivním nálezu přítomna lehká spastická paraparéza dolních končetin a centrální vestibulární syndrom s celkovým stupněm EDSS 3,5. V dalších letech se již neobjevila žádná ataka a fáze onemocnění byla hodnocena jako sekundárně progresivní. Kromě kortikosteroidů byla pacientka léčena přechodně imunosupresivem cyklofosfamid v dávce 50 mg obden orálně (1995-1997).

V září r. 2000 byla u pacientky stanovena diagnóza myelodysplastického syndromu, typ refrakterní anémie s nadbytkem blastů (MDS-RAEB). Pacientka byla z důvodu této hematologické diagnózy indikována k léčbě allogenní transplantací kmenových buněk. Léčba byla provedena v březnu r. 2001 s využitím ablativního režimu (BuCy2 - busulfan,



cyklofosfamid) a kmenových buněk od HLA shodného příbuzného dárce (bratr).

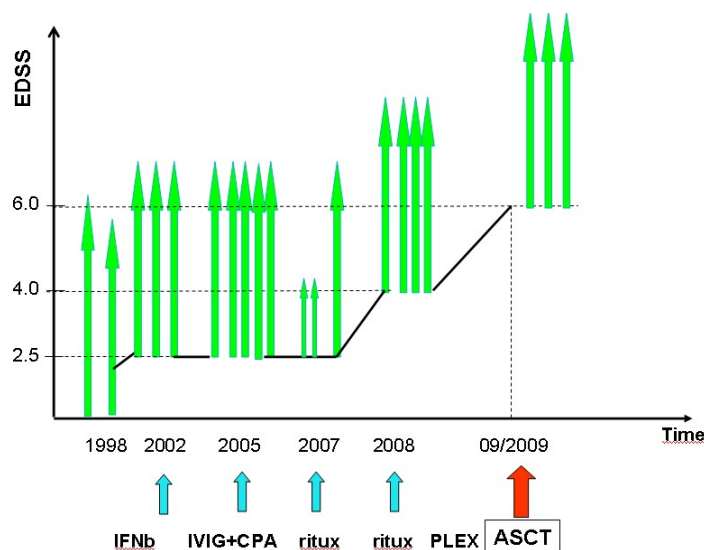
Neurologický nález byl v době léčby alloSCT hodnocen stupněm EDSS 4,0.

Po provedení alloSCT zůstává pacientka v hematologickém sledování s pravidelnou frekvencí návštěv (interval 1-4 týdny v prvním a druhém roce po alloSCT, dále interval 3-6 měsíců dosud) s pravidelným hodnocením aktivity hematologické diagnózy, dárcovské krevetvorby (chimerismu) a případných nežádoucích účinků alloSCT. Neurologické sledování v průběhu let 2001-2012 zahrnovalo klinické vyšetření neurologem se stanovením stupně EDSS ve tříměsíčních intervalech a MR mozku ve dvouletém intervalu.

### 3.4.2. Kazuistika pacientky s neuromyelitis optica léčené alloSCT

36-letá pacientka s diagnózou neuromyelitis optica dle Wingerchukových kritérií. K rozvoji prvních obtíží došlo v r. 1998 (ve 22 letech věku) – optická neuritis vpravo. MR mozku byla negativní, taktéž likvorologický nález nepodporoval diagnózu RS (0 oligoklonálních pásů). V následujících třech letech pacientka prodělala tři ataky s reziduálním postižením zraku (optická neuritis postupně na obou očích, levostranné hemiparestezie a lehká paréza levé dolní končetiny). MR mozku a likvorologický nález zůstával opakovaně neprůkazný pro RS, nicméně na onemocnění z okruhu demyelinizací CNS bylo podezření na základě charakteru relapsů a MR nálezu ložisek v krční a hrudní míše. Vzhledem k relapsům s reziduem byla u pacientky v listopadu 2002 zahájena léčba interferonem beta. Další postup léčby a pokračující aktivita NMO je znázorněna na Obr. č. 3.

Obr. č. 3.: Pacientka s neuromyelitis optica – relapsy, EDSS a léčba



zelená šipka = relaps NMO  
 IFNb – interferon beta  
 IVIG – intravenózní imunoglobuliny  
 CPA – cyklofosfamid pulzní léčba i.v.  
 ritux – rituximab  
 PLEX – pravidelné plazmaferézy 1x týdně  
 ASCT – autologní transplantace kmenových buněk

V r. 2007 bylo u pacientky pomocí nově dostupné metody stanovení NMO-IgG protilátek v krvi diagnostikováno onemocnění NMO. Veškerá konvenční léčba selhala a pacientce byla nabídnuta off-label léčba autologní transplantací kmenových buněk při stupni neurologického postižení EDSS 6,0. Tato léčba byla provedena v září r. 2009 (stejný režim BEAM jako u skupiny pacientů s RS léčených ASCT v kapitole č. 3.3), bohužel však do dvou měsíců po provedení ASCT došlo opět k rozvoji dalšího relapsu a v průběhu prvních šesti měsíců po ASCT k progresi EDSS na stupeň 6,5. Nepříznivému klinickému vývoji po ASCT odpovídala rovněž progresse nálezů na MR míchy s přítomností typického protáhlého ložiska délky 4-5 segmentů a vznik nových ložisek na MR mozku. Laboratorně s klinickou aktivitou onemocnění korelovala perzistence vysokých titrů protilátek NMO-IgG v krvi. Počátkem roku 2011 proto byla s pacientkou zahájena diskuze o možnosti allogenní transplantace kmenových buněk jako ultimum refugium v léčbě vysoce agresivního autoimunitního onemocnění.

Léčba alloSCT byla provedena v dubnu r. 2011 s využitím non-myeloablativního režimu (fludarabin, cyklofosfamid, ATG) a kmenových buněk od HLA shodného (10/10) nepříbuzného dárce opačného pohlaví. Neurologický nález byl v době léčby alloSCT hodnocen stupněm EDSS 6,5.

Po provedení alloSCT zůstává pacientka v hematologickém sledování s pravidelnou frekvencí návštěv (interval 1-4 týdny), hodnocením dárce krvetvorby a nežádoucích účinků alloSCT.

Neurologické sledování po alloSCT pokračuje v tříměsíčních intervalech (hodnocení relapsů, EDSS, titr NMO-IgG protilátek v krvi, MR mozku a míchy). Titry NMO-IgG protilátek jsou testovány metodou nepřímé imunofluorescence s využitím komerčního kitu Neurology Mosaic 17, Euroimmun.

### **3.5. Metody vyšetření lymfocytárních subpopulací a intracelulárních cytokinů**

#### **3.5.1. Média, reagentie a protilátky**

Pro analýzu povrchových markerů a intracelulárních cytokinů pomocí průtokové cytometrie byly použity následující zkumavky, reagentie a monoklonální protilátky:

##### Zkumavky:

- BD Vacutainer 5 ml s Natrium Heparinem k odběru krve (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)
- polypropylénové zkumavky pro kultivaci krevních buněk (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA)
- zkumavky BD Falcon 12x75 mm pro značení buněk (BD Biosciences)

##### Reagentie pro kultivaci a stimulaci buněk:

- RPMI „Roswell Park Memorial Insitute“ medium 1640 (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Brefeldin A (BFA) – transport inhibitor protein; v koncentraci po zředění 10 µg/ml (Sigma Aldrich, St. Luis, MO, USA)
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) – mitogen; v koncentraci po zředění 20 ng/ml (Sigma Aldrich)
- Ionomycin – ionofor; v koncentraci po zředění 1 µg/ml (Sigma Aldrich)
- Lipopolysacharid (LPS) – mitogen; v koncentraci po zředění 1 µg/ml (Sigma Aldrich)
- Fytohemaglutinin (PHA) - v koncentraci po zředění 1 µg/ml (Wellcome, Datford, England)

##### Monoklonální protilátky – konjugované s fluorochromem, BD Biosciences:

- CD3-FITC (fluorescein isothiocyanate)
- CD3-PerPC (peridinin chlorophyll protein)
- CD4-APC Cy7 (allophycocyanin)
- CD8-PE Cy7 (phycoerythrin)

- CD19-PE
- CD5-PE
- CD16+56-PE
- HLA-DR-PE
- CD45RA-FITC
- CD14-FITC
- TNF $\alpha$ - PE Cy7
- IFN $\gamma$ -FITC
- IL2-APC
- IL4-PE
- IL10-PE
- IL12-APC

Ostatní materiál:

- FACS permeabilizační roztok (BD Biosciences)
- FACS lyzační roztok (BD Biosciences)
- promývací roztok: CellWASH (BD Biosciences)
- fixační roztok: CellFIX (BD Biosciences)

Průtoková cytometrie, přístroj:

- FACSCanto (Fluorescence Activated Cell Sorter, BD Biosciences) + software BD FACSDiva 5,03 (BD Biosciences)

### **3.5.2. Průtoková cytometrie**

#### **3.5.2.1. Kultivace lymfocytů**

1. do kultivační zkumavky bylo napipetováno 500  $\mu$ l RPMI 1640 + 10  $\mu$ l PHA s 500  $\mu$ l plné periferní krve
2. zkumavka byla vložena do inkubátoru (při teplotě 37 °C a 5% koncentraci CO<sub>2</sub>) na 20-22 hodin
3. poté bylo do zkumavky přidáno 10  $\mu$ l BFA + 10  $\mu$ l PMA + 10  $\mu$ l ionomycinu

4. zkumavka byla vložena do inkubátoru (při teplotě 37 °C a 5% koncentraci CO<sub>2</sub>) na 4,5 hodiny

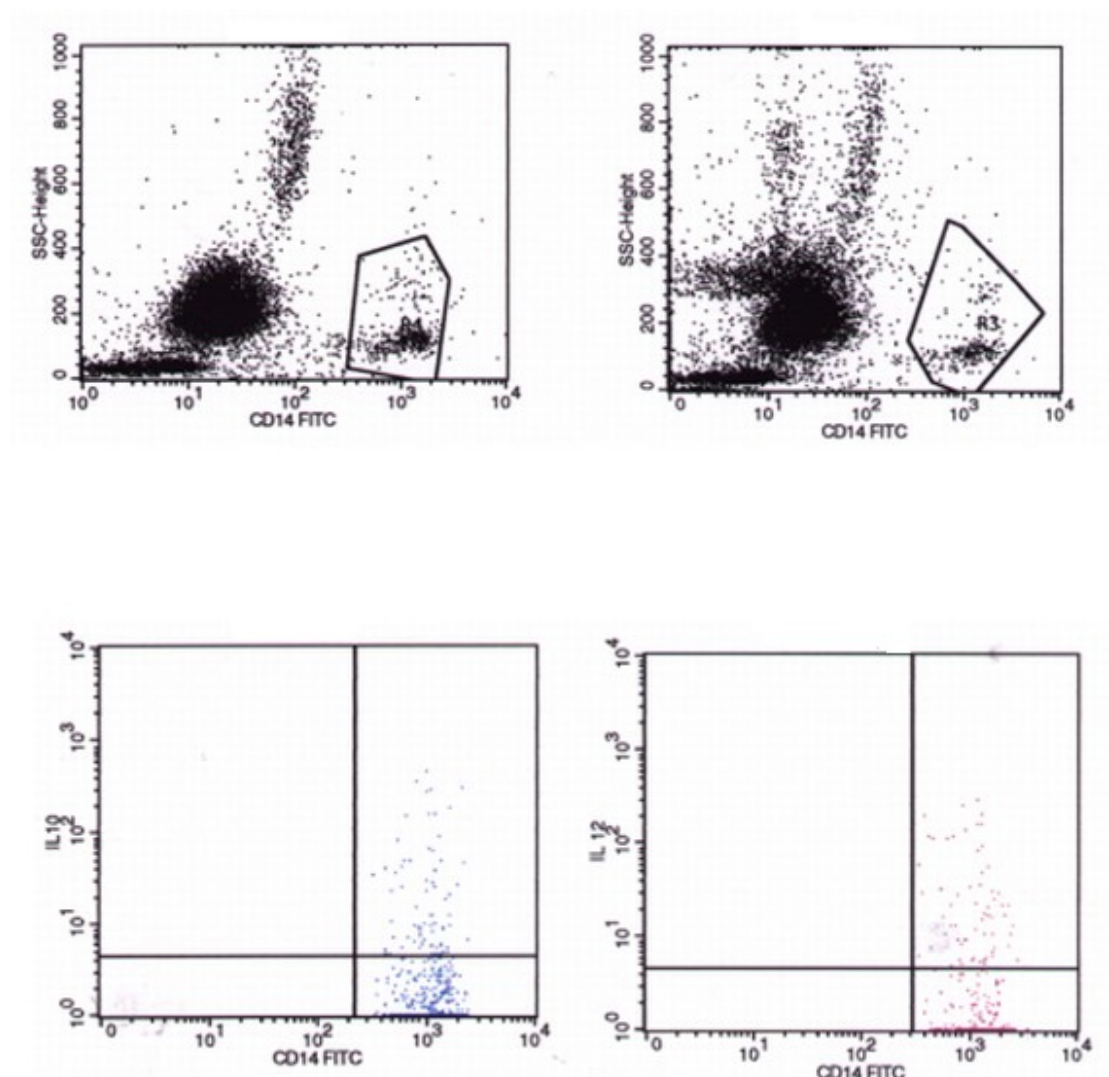
#### **3.5.2.2. Kultivace monocytů**

1. do kultivační zkumavky bylo napipetováno 10 µl LPS s 500 µl plné periferní krve
2. zkumavka byla vložena do inkubátoru (při teplotě 37 °C a 5% koncentraci CO<sub>2</sub>) na 20-22 hodin
3. poté bylo do zkumavky přidáno 10 µl BFA
4. zkumavka byla vložena do inkubátoru (při teplotě 37 °C a 5% koncentraci CO<sub>2</sub>) na 4,5 hodiny

#### **3.5.2.3. Metoda stanovení intracelulárních cytokinů**

1. 100 µl kultivované krve (viz výše) + 20 µl monoklonální protilátky proti povrchovým antigenům (CD3, CD14) bylo inkubováno 20 minut v temnu za pokojové teploty
2. pro lýzu erytrocytů a fixaci lymfocytů byl přidán lyzační roztok (2 ml) a vše inkubováno 10 minut v temnu za pokojové teploty. Následně byla zkumavka centrifugována (1000 rpm celkem 5 minut) a byl odstraněn supernatant
3. do zkumavky bylo přidáno 500 µl permeabilizačního roztoku, inkubováno 10 minut v temnu za pokojové teploty. Přidán promývací roztok, centrifugováno a opět odstraněn supernatant
4. přidáno 20 µl příslušné monoklonální protilátky proti intracelulárnímu antigenu, inkubováno 25 minut v temnu při pokojové teplotě. Poté byl vzorek dvakrát promyt promývacím roztokem
5. intracelulární cytokiny byly analyzovány na průtokovém cytometru. T-lymfocyty byly ohraničeny pomocí FSC (forward scatter) a CD3; monocyty byly ohraničeny pomocí SSC (side scatter) a CD14.

Obr. č. 3.: Příklad stanovení intracelulárních cytokinů (interleukin 10 a 12) v monocytech (CD14+)



#### 3.5.2.4. Značení povrchových buněčných markerů

Plná periferní krev byla inkubována v přítomnosti příslušné monoklonální protilátky v temnu za pokojové teploty (20-25 °C) 15 minut. Po lyzační a promývacích fázích, byla provedena šestibarevná analýza průtokovým cytometrem FACSCanto.

### 3.6. Statistická analýza

Analýza dat dlouhodobě sledované skupiny pacientů léčených ASCT zahrnovala výpočet intervalu bez progresu (PFS – progression free survival) s využitím Kaplan-Meierovy

křivky, porovnání PFS jednotlivých skupin pomocí Coxova F testu a porovnání incidence relapsů (tzv. relapse-rate) pomocí neparametrického párového sign testu.

Pro porovnání sledovaných skupin ve vztahu k imunologickým parametrům byl použit dvouvýběrový (nepárový), oboustranný Studentův t-test. ANOVA (Analysis Of Variance) test byl využit při hodnocení rozdílů vývoje jednotlivých imunologických parametrů mezi sledovanými skupinami. K nalezení možného predikčního ukazatele pro jednotlivé parametry vývoje onemocnění byla použita mnohočetná regresní analýza, přičemž statisticky nevýznamné ukazatele byly postupně z analýzy vyloučeny. Veškeré statistické výpočty byly provedeny pomocí programu STATISTICA 8 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA). Rozhodovací křivka pro zhodnocení diagnostické přesnosti predikčního faktoru vzhledem ke klinickému parametru byla vypočítána pomocí aplikace dostupné na webových stránkách:

<http://www.jrocf.it.org> (May 2006).

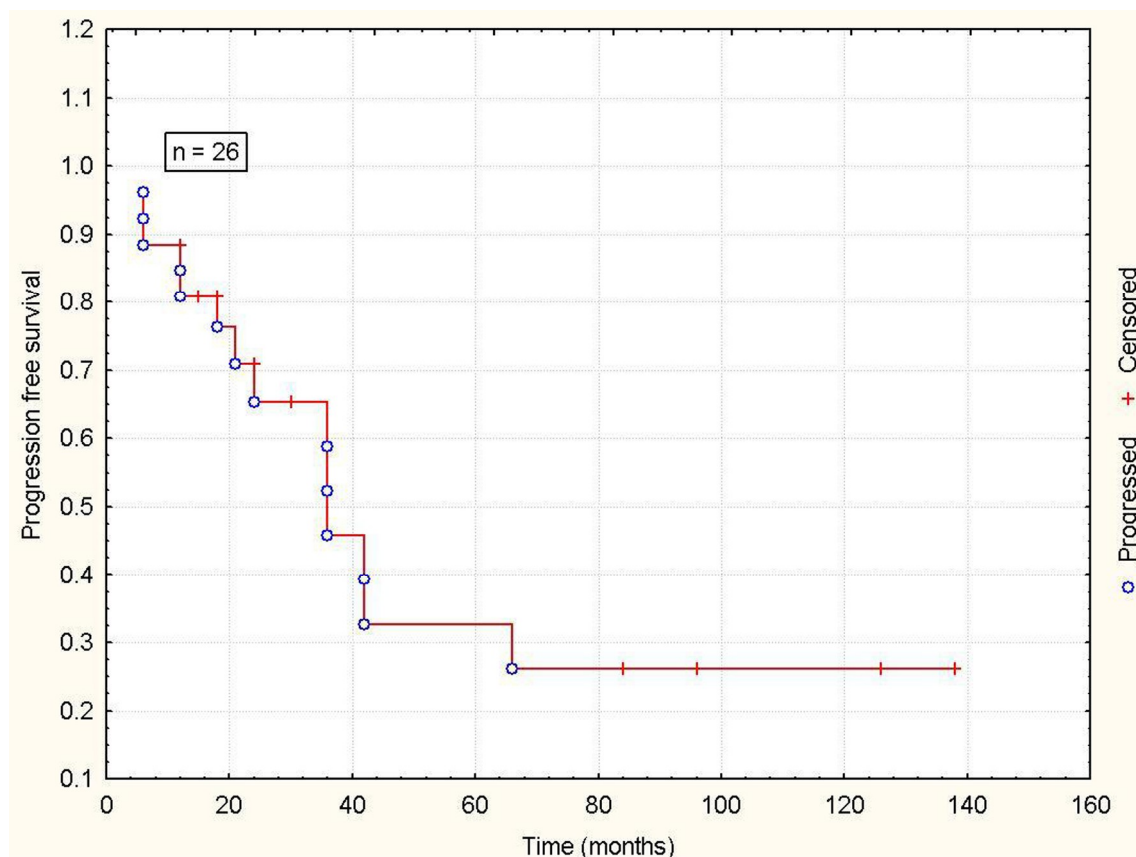
## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Výsledky retrospektivního sledování skupiny pacientů léčených vysokodávkovanou imunoablací s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk (ASCT) v letech 1998-2008

#### 4.1.1. Klinické výstupy – počet relapsů, progresse, léčba po ASCT

1. celý soubor 26 pacientů byl zahrnut do analýzy, délka sledování dosáhla 11-132 měsíců (medián 66 měsíců). Interval bez progresse (progression free survival, PFS) - měřený pomocí změny hodnoty EDSS – činil 70,8% po třiletém a 29,2% po šestiletém sledování (Graf. č. 1).

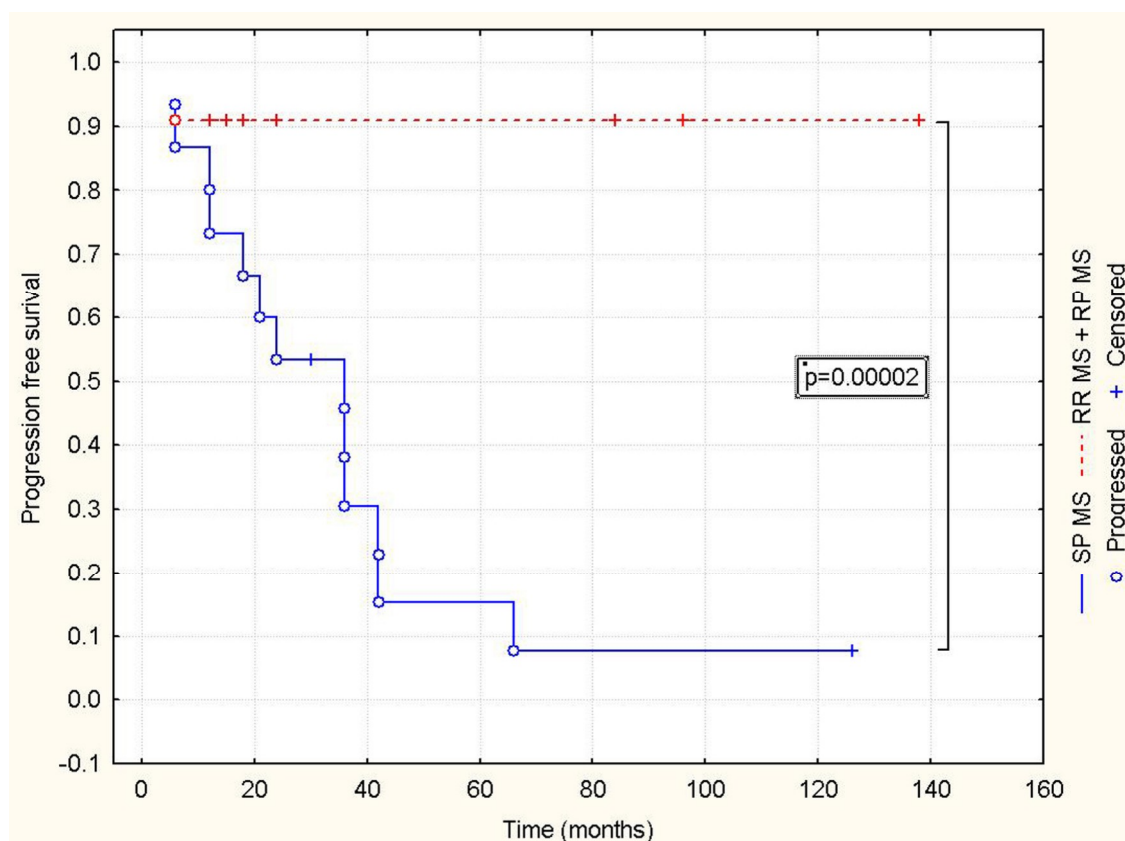
Graf. č. 1: Interval bez progresse (PFS) u celé sledované skupiny 26 pacientů





2. PFS v rámci tříletého sledování u pacientů s RR-RS (n=11, délka sledování 11-132 měsíců, medián 19 měsíců) byl 84,4% ve srovnání s 60% u pacientů se SP-RS formou onemocnění (n=15, délka sledování 30-130 měsíců, medián 96 měsíců) – Graf č. 2. Rozdíl mezi křivkami PFS mezi pacienty s RR-RS a SP-RS dosáhl statistické významnosti -  $F(2, 26) = 16,65527$ ,  $p = 0,00002$ . Riziko pravděpodobnosti progresse bylo 5,1 po třech letech a 39 po šesti letech (interval spolehlivosti nezobrazen pro malý počet dat, která byla k dispozici pro analýzu).

Graf č. 2: Interval bez progresse (PFS) u pacientů s relaps-remitentní (n=11) versus sekundárně-progresivní formou RS (n=15)

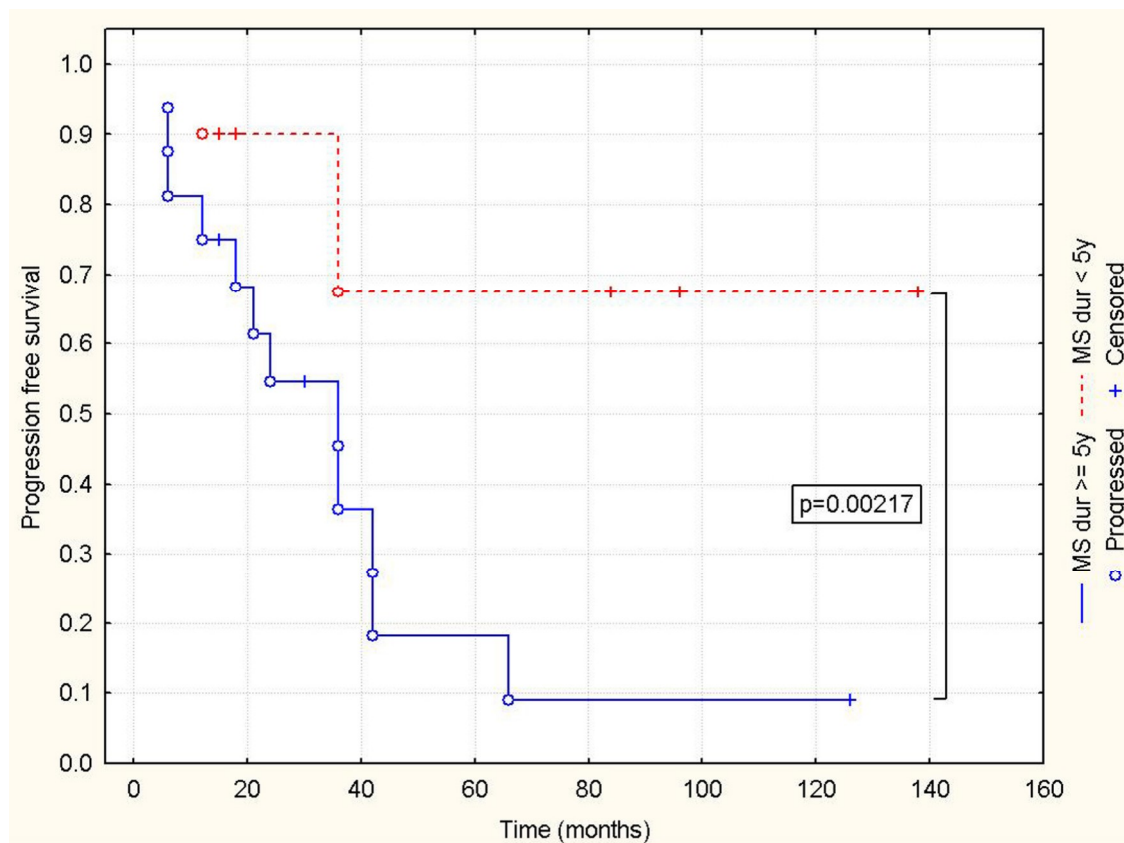


3. v hodnotě PFS nebylo dosaženo statisticky významného rozdílu mezi pacienty s  $EDSS < 6$  (n=8) a  $EDSS \geq 6$  (n=18).

4. skupina pacientů s délkou trvání choroby méně než 5 let dosáhla signifikantně lepšího výsledku PFS,  $F(4, 24) = 5,745650$ ,  $p = 0,00217$ . PFS po třech letech ve skupině pacientů s délkou trvání onemocnění  $< 5$  let (n=6, délka sledování 11-132 měsíců, medián 18 měsíců) činil 82,3% ve srovnání s 61,8% ve skupině pacientů s délkou trvání RS  $\geq 5$  let (n=20, délka sledování 14-130 měsíců, medián 73 měsíců) – Graf č. 3. Riziko

pravděpodobnosti progresu bylo 8,25 u pacientů s délkou trvání RS méně než 5 let a 18 u pacientů s délkou trvání RS  $\geq 5$  let.

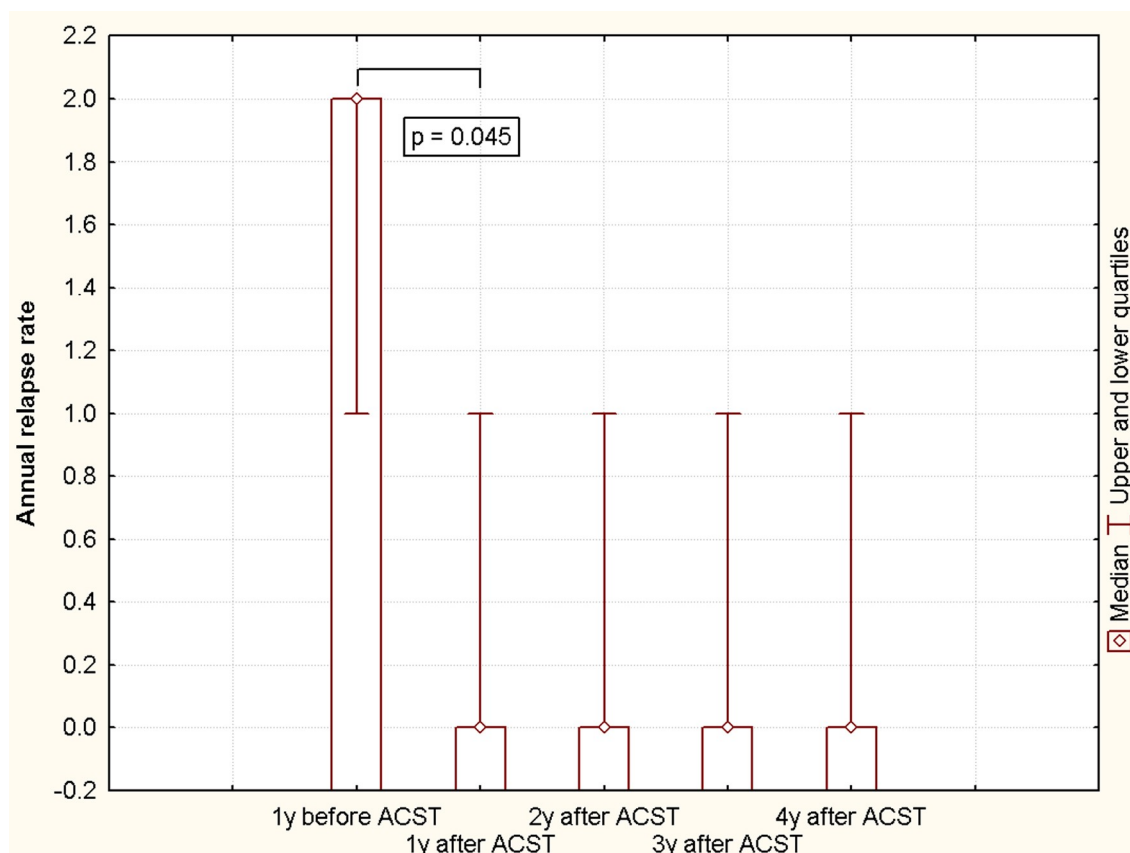
Graf č. 3: Interval bez progresu (PFS) podle délky trvání RS



5. statistické významnosti dosáhl rozdíl mezi křivkami PFS u pacientů s věkem pod 35 let oproti starším pacientům,  $F(12, 16) = 3,468337$ ,  $p = 0,01118$ . U všech pacientů starších 35 let progredoval neurologický nálezný měřený škálou EDSS před dosažením konce čtyřletého sledování.

6. medián ročního počtu relapsů v roce před léčbou ASCT byl 2 (1. kvartil 1, 3. kvartil 2), zatímco medián ročního počtu relapsů v prvních dvou letech po ASCT byl 0 (1. kvartil 0, 3. kvartil 1). Rozdíl byl statisticky významný (Sign test,  $p = 0,045$ ) – Graf č. 4.

Graf č. 4: Roční počet relapsů před a první dva roky po léčbě ASCT



Dlouhodobá léčba RS po ASCT zahrnovala interferon beta (n=2), glatiramer acetát (n=9), intravenózní imunoglobuliny – IVIG (n=13), intravenózní pulzy cyklofosfamidu (n=5, kumulativní dávka 1-13 g, průměrná dávka 5 g), intravenózní pulzy mitoxantronu (n=1, kumulativní dávka 40 mg) a azathioprin (n=5, kumulativní dávka 30-141 g, průměrná dávka 67 g). Jeden pacient byl léčen mykofenolát mofetilem (kumulativní dávka 1440 g), dva pacienti byli léčeni cyklosporinem A. Všichni pacienti byli po ASCT dlouhodobě léčeni nízkou dávkou kortikosteroidů (do maximální denní dávky ekvivalentní 10 mg prednisolonu orálně). Léčba RS po ASCT je shrnuta v Tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Léčba RS před a po ASCT

	<b>před ASCT – počet pacientů</b>	<b>po ASCT – počet pacientů</b>	<b>průměrná doba od ASCT do zahájení další léčby (měsíců)</b>	<b>průměrná délka trvání léčby (měsíců)</b>
interferon beta	21	2	2	25
glatiramer acetát	6	9	19	22
≥ 2 DMDs	10	0	-	-
intravenózní imunoglobuliny	11	13	12	26
cyklofosfamid (průměrná kumulativní dávka)	19 (8 g)	5 (5 g)	45	6
mitoxantron (průměrná kumulativní dávka)	16 (90 mg)	1 (40 mg)	41	5
orální imunosupresiva	25	8	36	50
nízko-dávkované kortikosteroidy	26 (100%)	26 (100%)	1	65

DMDs – disease modifying drugs (interferony beta a glatiramer acetát)

orální imunosupresiva – azathioprin, mycofenolát mofetil, cyklosporin A

#### 4.1.2. Bezpečnost

Úmrtnost spojená s léčbou ASCT (transplant related mortality, TRM) byla v našem souboru pacientů 0%. V průběhu dlouhodobého sledování (více než 100 dnů po ASCT) byly zaznamenány celkem dvě úmrtí. 49-letá žena zemřela 30 měsíců po ASCT na extramurálním pracovišti pro komplikovanou, pozdně diagnostikovanou peritonitidu. Ve druhém případě byl u 40-letého muže diagnostikován 39 měsíců po ASCT zhoubný tumor CNS glioblastoma multiforme, na který pacient 60 měsíců po ASCT zemřel.

Časné nežádoucí účinky během prvních 100 dnů po ASCT byly vyhodnoceny u 25 pacientů (data jedné pacientky byla skartována). Zahrnovaly febrilní neutropenii (n=14), sepsi (n=10), infekci močových cest (n=7), průjem (n=16) a těžkou mukositidu stupně II-III (n=11).

Jedna pacientka vyvinula bolesti kloubů s pozitivitou revmatoidního faktoru 2 měsíce po ASCT.

Pozdní nežádoucí účinky (po více než 100 dnech po ASCT) zahrnovaly závažnou sepsi (n=1, 6 měsíců po ASCT), recidivující herpetické infekce – labiální herpes simplex virus typu I a výsev varicella zoster viru v genitální oblasti s akutní močovou retencí (n=1, 9 měsíců po ASCT), chronickou hepatitis typu B (n=1, 24 měsíců po ASCT) a glioblastoma multiforme (n=1, 39 měsíců po ASCT). Jedna pacientka vyvinula 15 měsíců po ASCT akutní krvácivé projevy (epistaxe, kožní sufúze). Jako příčina těchto projevů byla diagnostikována vzácná, získaná pozitivita inhibitoru faktoru VIII koagulační kaskády.

Časné a pozdní nežádoucí účinky ASCT jsou shrnuty v Tabulce č. 7.

Tabulka č. 7: Časné a pozdní nežádoucí účinky ASCT

<b>Časné nežádoucí účinky</b>	Počet pacientů (%)	<b>Pozdní nežádoucí účinky</b>	Počet pacientů
Febrilní neutropenie	14 (56%)	Sepse	1
Sepse	10 (40%)	Recidivující herpetické infekce (HSV, VZV) <sup>b</sup>	1
Infekce močových cest	7 (28%)	Chronická hepatitis B	1
Ostatní infekce	5 (20%)	Získaný inhibitor faktoru VIII	1
Průjem	16 (64%)	Glioblastoma multiforme	1
Mukositida (stupeň II-III)	11 (44%)		
Bolesti kloubů s pozitivitou RF <sup>a</sup>	1		

<sup>a</sup>RF - revmatoidní faktor

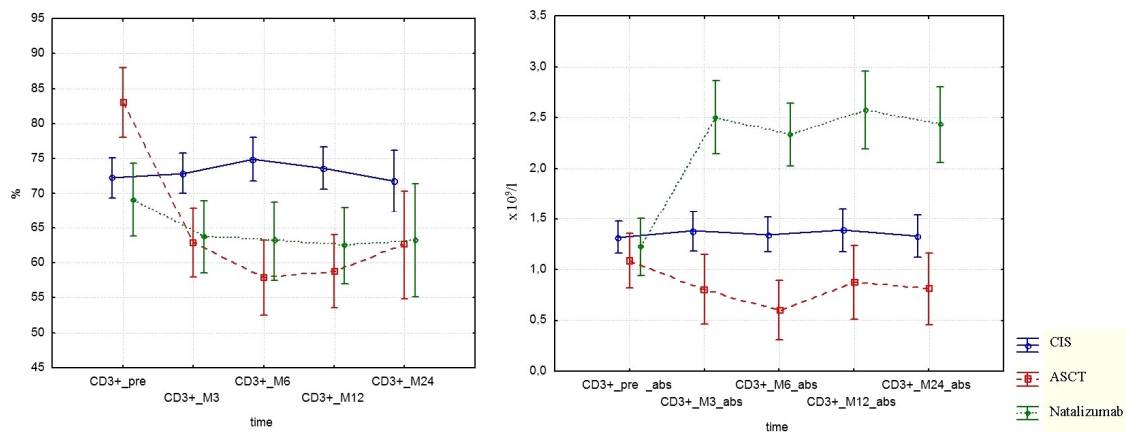
<sup>b</sup>HSV - herpes simplex virus, VZV - varicella zoster virus

## 4.2. Prospektivní sledování vývoje lymfocytárních subpopulací a intracelulárních cytokinů v periferní krvi

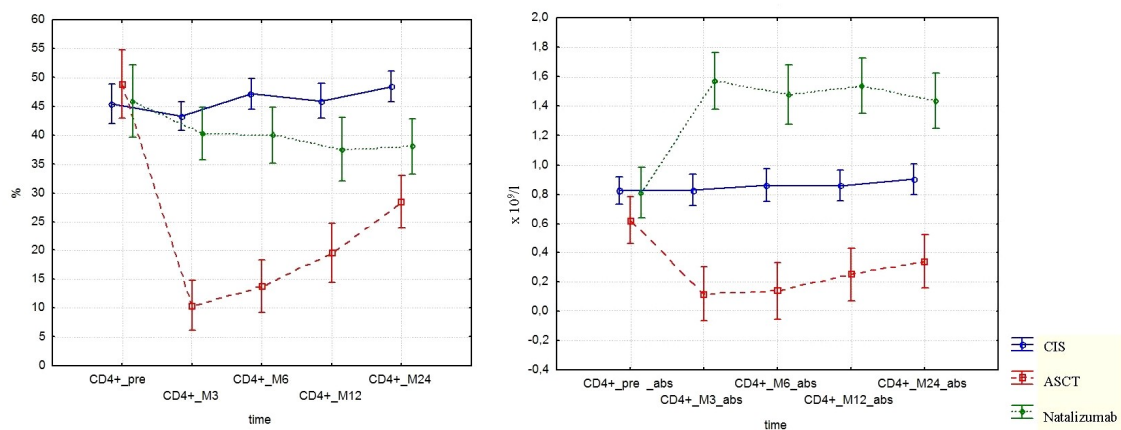
V rámci práce bylo zpracováno dvouleté sledování lymfocytárních subpopulací periferní krve u pacientů s RS všech tří zvolených skupin v procentuálních (%) a absolutních (abs) hodnotách. Vývoje jednotlivých sledovaných subpopulací jsou znázorněny v grafech č.

5-9. Statistický rozdíl v imunologických parametrech mezi jednotlivými skupinami byl signifikantní po korekci mnohočetného testování.

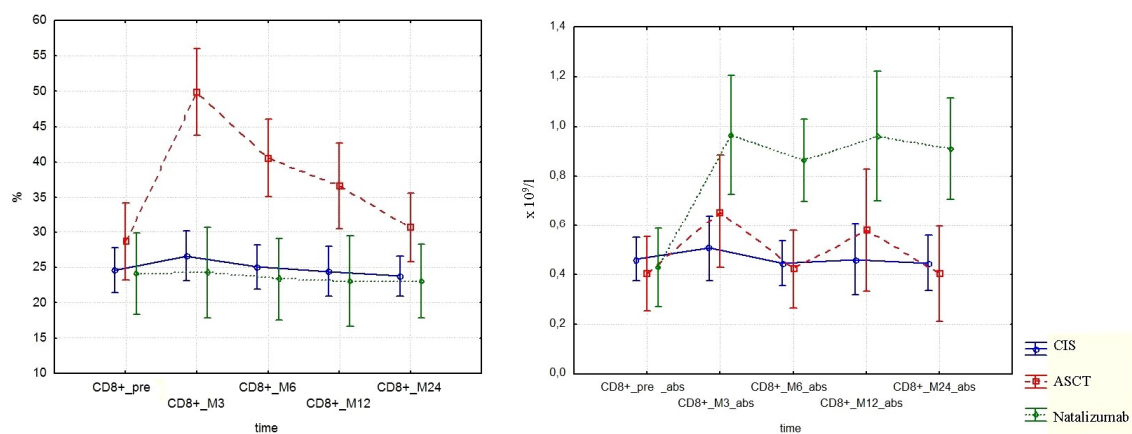
Graf č. 5: Dvouleté sledování subpopulace CD3+ lymfocytů (% a abs hodnoty)



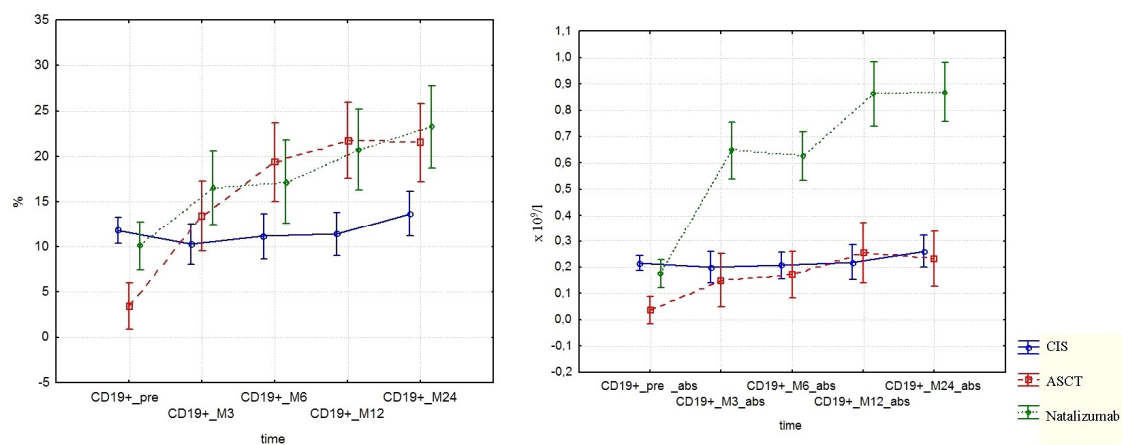
Graf č. 6: Dvouleté sledování subpopulace CD4+ lymfocytů (% a abs hodnoty)



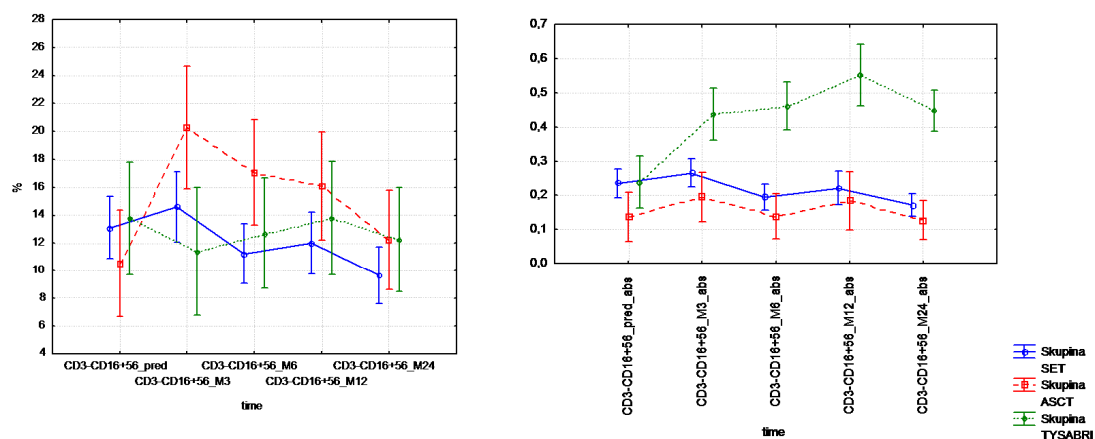
Graf č. 7: Dvoutleté sledování subpopulace CD8+ lymfocytů (% a abs hodnoty)



Graf č. 8: Dvoutleté sledování subpopulace CD19+ lymfocytů (% a abs hodnoty)



Graf č. 9: Dvoutleté sledování subpopulace CD16+56 NK buněk (% a abs hodnoty)



### 4.3. Výsledky statistického zpracování lymfocytárních subpopulací a intracelulárních cytokinů souhrnně u vybraných tří skupin pacientů ve vztahu ke klinické aktivitě onemocnění

V rámci souhrnné analýzy všech tří vybraných skupin pacientů byly porovnány jednotlivé imunologické parametry (vstupní hodnota před léčbou, hodnota ve 3. a 6. měsíci léčby) s přítomností relapsů RS mezi 6. a 24. měsícem sledování. V testovaných parametrech nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v imunologických parametrech (absolutní a procentuální hodnoty subpopulací) mezi pacienty bez relapsu a pacienty s relapsem (v Tabulce č. 8 uvedeno zpracování procentuálních hodnot parametrů).

Tabulka č. 8: Sledované imunologické parametry u pacientů bez relapsu versus s relapsem

	PŘED LÉČBOU			3. MĚSÍC LÉČBY			6. MĚSÍC LÉČBY		
	průměr (bez relapsu)	průměr (s relapsem)	p	průměr (bez relapsu)	průměr (s relapsem)	p	průměr (bez relapsu)	průměr (s relapsem)	p
lymfocyty (abs)	1,75667	1,62500	0,331419	2,41852	2,18571	0,537509	2,28000	1,57143	0,036116
CD3+ (%)	71,47000	72,86250	0,683487	67,82963	69,11429	0,629379	67,55667	69,28571	0,811277
CD4+ (%)	44,04000	49,15000	0,233125	35,96296	35,25714	0,917147	38,90333	39,90000	0,906177
CD8+ (%)	25,28667	21,91250	0,168542	29,79259	30,98571	0,838037	26,55667	29,22857	0,679567
IRI	2,04333	2,41250	0,364326	1,59259	1,50000	0,837286	1,73667	1,88571	0,813450
CD19+ (%)	9,69000	10,93750	0,533132	11,98519	12,47143	0,872498	14,01333	13,37143	0,901817
CD3-CD16+56 (%)	14,39667	13,67500	0,819669	14,86667	16,27143	0,617655	13,23000	12,34286	0,773444
CD3+CD16+56 (%)	1,88148	1,68333	0,860357	1,80000	2,90000	0,621904	0,89667	1,11429	0,733117
CD3+HLADR+ (%)	12,13000	10,32500	0,516768	14,16296	19,28571	0,471252	12,32333	17,45714	0,520773
CD45RA+ (%)	62,39667	63,06250	0,893670	59,89630	65,50000	0,244101	64,11000	63,70000	0,905965
CD5+ (%)	71,32000	70,07500	0,678859	68,32222	68,94286	0,832754	68,37667	71,58571	0,587612
CD4+CD45RA+ (%)	26,72333	31,41250	0,350981	20,60000	23,44286	0,640359	23,84000	20,72857	0,618467
CD5+CD19+ (%)	2,16000	1,61250	0,464097	2,96667	2,67143	0,675465	3,19667	1,87143	0,127186
IFN gamma	27,81786	21,51250	0,116904	37,17500	28,91667	0,351674	33,17931	40,66667	0,578757
TNF alfa	49,31071	46,68750	0,669568	50,96667	42,56667	0,164052	46,74828	44,25000	0,789296
Interleukin 2	39,98929	43,87500	0,447587	33,83750	31,75000	0,756697	34,15862	34,90000	0,880534
Interleukin 4	5,98571	4,76250	0,375825	4,97083	3,86667	0,342589	5,02414	8,25000	0,156088
Interleukin 10	15,63462	16,80000	0,763376	16,89600	18,48333	0,525785	19,49615	13,53333	0,232150
Interleukin 12	23,73929	21,27500	0,483854	24,85769	27,60000	0,560981	24,83571	23,15714	0,775559



Dále byly porovnány jednotlivé imunologické parametry (lymfocytární subpopulace v absolutních i procentuálních hodnotách) v časových intervalech před léčbou a ve 3. a 6. měsíci léčby u pacientů bez progresí invalidity a pacientů s progresí mezi 6. a 24. měsícem sledování (Tabulka č. 9 a 10).

Tabulka č. 9: Sledované imunologické parametry u pacientů bez progresí invalidity versus s progresí (% hodnoty lymfocytárních subpopulací)

	PŘED LÉČBOU			3. MĚSÍC LÉČBY			6. MĚSÍC LÉČBY		
	průměr (bez progrese)	průměr (s progresí)	p	průměr (bez progrese)	průměr (s progresí)	p	průměr (bez progrese)	průměr (s progresí)	p
lymfocyty (abs)	1,78706	1,66667	0,777755	2,33261	1,20000	0,062824	2,17347	1,03333	0,062170
CD3+ (%)	73,30000	60,53333	0,225784	69,65000	62,56667	0,444237	69,79184	55,43333	0,040178
CD4+ (%)	45,62549	40,90000	0,734301	37,15217	27,36667	0,427201	40,03878	30,63333	0,277429
CD8+ (%)	25,56863	17,03333	0,017989	30,46087	33,50000	0,730785	27,66939	24,50000	0,638648
IRI	2,02941	2,60000	0,608737	1,57826	1,03333	0,451640	1,75510	1,83333	0,904420
CD19+ (%)	10,52941	10,90000	0,949278	12,53478	12,86667	0,900299	13,62653	25,33333	0,014180
CD3-CD16+56 (%)	12,84706	23,96667	0,446167	14,40217	18,20000	0,617218	12,22245	16,56667	0,280020
CD3+CD16+56 (%)	2,11386	0,30000	0,000001	2,06000	0,26667	0,000038	1,18085	0,26667	0,218668
CD3+HLADR+ (%)	12,02745	4,76667	0,000000	16,71304	17,30000	0,897183	14,15714	7,90000	0,423303
CD45RA+ (%)	63,02157	64,90000	0,722918	61,68478	57,66667	0,023101	64,45714	69,86667	0,354331
CD5+ (%)	72,54314	62,76667	0,368772	70,22826	64,56667	0,476480	70,93878	58,23333	0,027992
CD4+CD45RA+ (%)	28,66863	23,20000	0,367781	22,53478	17,00000	0,744378	24,86939	14,33333	0,214547
CD5+CD19+ (%)	2,31196	2,20000	0,849945	3,18043	3,53333	0,754373	3,62245	4,90000	0,496364
IFN gamma	26,35833	18,63333	0,251918	36,63500	30,10000	0,689664	33,41087	53,46667	0,068436
TNF alfa	49,28333	36,63333	0,099533	50,15500	40,13333	0,350820	45,65217	44,86667	0,929427
Interleukin 2	38,45208	36,50000	0,603429	34,16000	27,20000	0,416599	33,91739	26,56667	0,274329
Interleukin 4	5,55417	3,83333	0,091100	5,07000	5,70000	0,680940	5,46087	6,40000	0,662956
Interleukin 10	16,65319	15,90000	0,946681	18,28250	22,06667	0,235317	20,50444	19,00000	0,809161
Interleukin 12	23,04286	22,43333	0,793358	25,97381	32,03333	0,448243	26,83404	13,96667	0,072960

Tabulka č. 10: Vybrané sledované lymfocytární subpopulace u pacientů s progresí invalidity versus bez progresí (absolutní hodnoty)

	PŘED LÉČBOU			3. MĚSÍC LÉČBY			6. MĚSÍC LÉČBY		
	průměr (bez progrese)	průměr (s progresí)	p	průměr (bez progrese)	průměr (s progresí)	p	průměr (bez progrese)	průměr (s progresí)	p
CD3+ (abs)	1,31	1,09	0,108246	1,62	1,12	0,057247	1,51	0,86	0,001655
CD4+ (abs)	0,81	0,70	0,201882	0,92	0,60	0,085837	0,92	0,48	0,006919
CD8+ (abs)	0,47	0,36	0,113131	0,67	0,49	0,077536	0,56	0,34	0,001652
CD19+ (abs)	0,19	0,11	0,010775	0,30	0,22	0,291395	0,30	0,22	0,211586
CD3-CD16+56 (abs)	0,23	0,27	0,643490	0,30	0,25	0,245027	0,26	0,17	0,028925

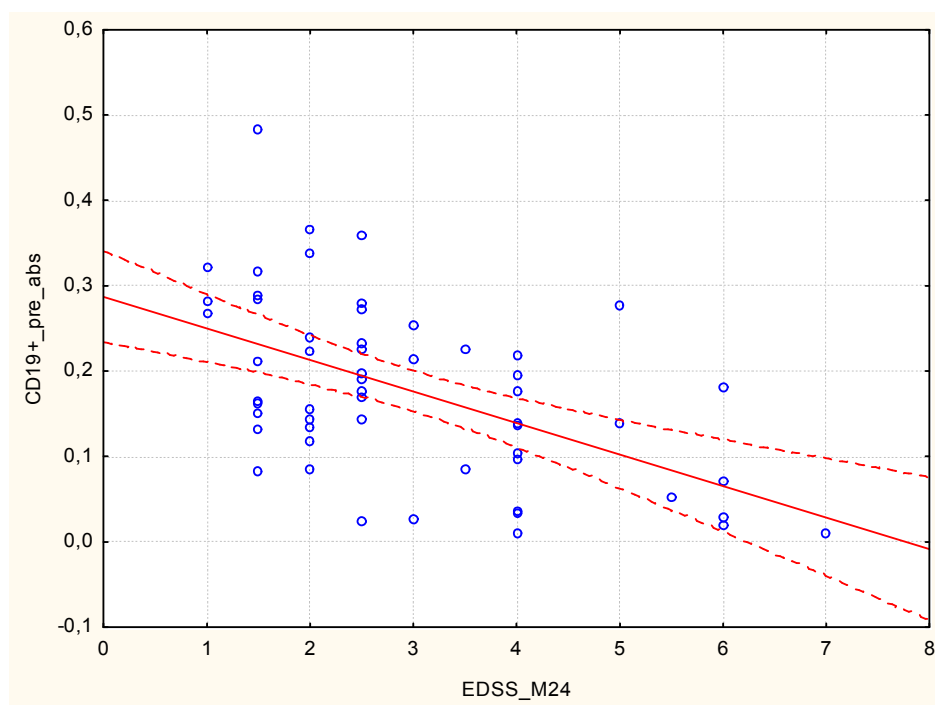
Ze vstupních hodnot imunologických parametrů před léčbou byl prokázán statisticky vyšší absolutní počet CD19+ lymfocytů u pacientů bez progresí versus s progresí ( $p=0,01$ , průměr 0,19 versus 0,11). U vyšetřovaných parametrů ve 3. měsíci léčby byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi pacienty bez progresí a s progresí v absolutní hodnotě CD3+ lymfocytů ( $p=0,057$ ). V 6. měsíci léčby byly nalezeny statisticky signifikantní rozdíly mezi pacienty bez progresí a s progresí u parametrů CD3+% ( $p=0,04$ ), CD19% ( $p=0,014$ ), CD5+% ( $p=0,028$ ), CD3+abs ( $p=0,002$ ), CD4+abs ( $p=0,007$ ) a CD8+abs ( $p=0,002$ ).

Pro další analýzu byly využity imunologické parametry z doby před léčbou a po třech měsících léčby. Mnohočetná regresní analýza (počínající všemi parametry vstupními a v měsíci 3) ukázala statisticky signifikantní schopnost absolutní hodnoty CD19+ lymfocytů před zahájením léčby predikovat hodnotu EDSS v měsíci 24 ( $-F(1,54)=21,04$ ,  $p<0,001$ ,  $R^2=0,27$ ,  $R=0,53$ ) – Graf č. 10.

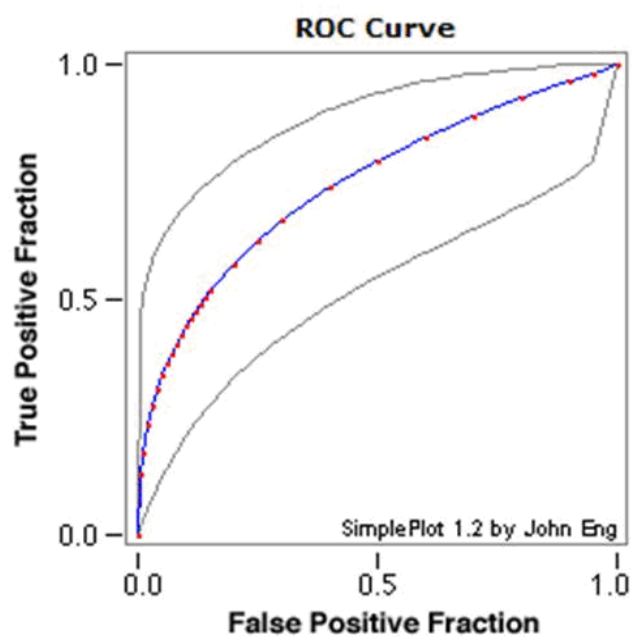
Vstupní absolutní hodnota CD19+ lymfocytů dohromady s procentuální hodnotou CD3+ lymfocytů ve 3. měsíci sledování pak ukázaly predikční potenciál ve vztahu k hodnotě EDSS v měsíci 24 s ještě vyšší statistickou významností ( $-F(2,49)=15,6$ ,  $p<0,001$ ,  $R^2=0,39$ ,  $R=0,62$ ).

Absolutní hodnota 0,2 CD19+lymfocytů před léčbou odlišila pacienty bez progresí oproti pacientům s progresí k 24. měsíci sledování se sensitivitou 81% a specificitou 46% - Graf č. 11.

Graf č. 10: Mnohočetná regresní analýza: EDSS ve 24. měsíci sledování a prediktivní ukazatel absolutní hodnota CD19+ lymfocytů před léčbou

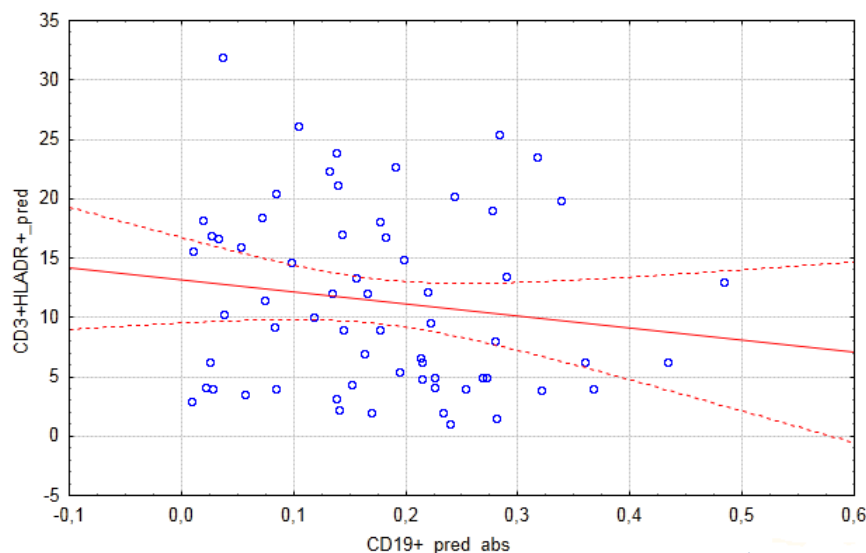


Graf č. 11: The receiver-operator curve – absolutní hodnota CD19+ lymfocytů před zahájením léčby rozlišuje pacienty bez progresu a pacienty s progresí se sensitivitou 81% a specificitou 46%



Ze všech sledovaných imunologických parametrů korelovala s absolutní hodnotou CD19+ lymfocytů před léčbou pouze procentuální hodnota CD3+HLADR+ aktivovaných T-lymfocytů před léčbou ( $R=0,42$ ,  $p=0,001$ ) - Graf č. 12.

Graf č. 12: Korelace CD19+abs s CD3+HLADR+% před léčbou



#### 4.4. Hodnocení léčby allogenní transplantací kmenových buněk u dvou patientek s autoimunitním onemocněním CNS (efektivita a bezpečnost)

##### 4.4.1. Kazuistika pacientky se sekundárně progresivní RS léčené alloSCT pro diagnózu myelodysplastického syndromu

Léčba alloSCT byla u pacientky s RS provedena v březnu r. 2001 bez známek akutní reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host disease, GvHD) s dosažením 100% chimerismu dárcovské krvetvorby. Přechodná imunosupresivní profylaxe zahrnovala cyklosporin A a mykofenolát mofetil orálně. Nedošlo k rozvoji žádných příznaků chronické GvHD a pacientka zůstává jedenáct let po léčbě alloSCT hematologicky v kompletní remisi.

Neurologicky byla alloSCT provedena ve fázi SP-RS při stupni EDSS 4,0. Pacientka do letošního roku 2012 zůstává bez významné progresy objektivního neurologického nálezu (EDSS zůstává 4,0) i MR nálezů. Léčba RS po alloSCT zahrnuje prednisolon 5 mg obden

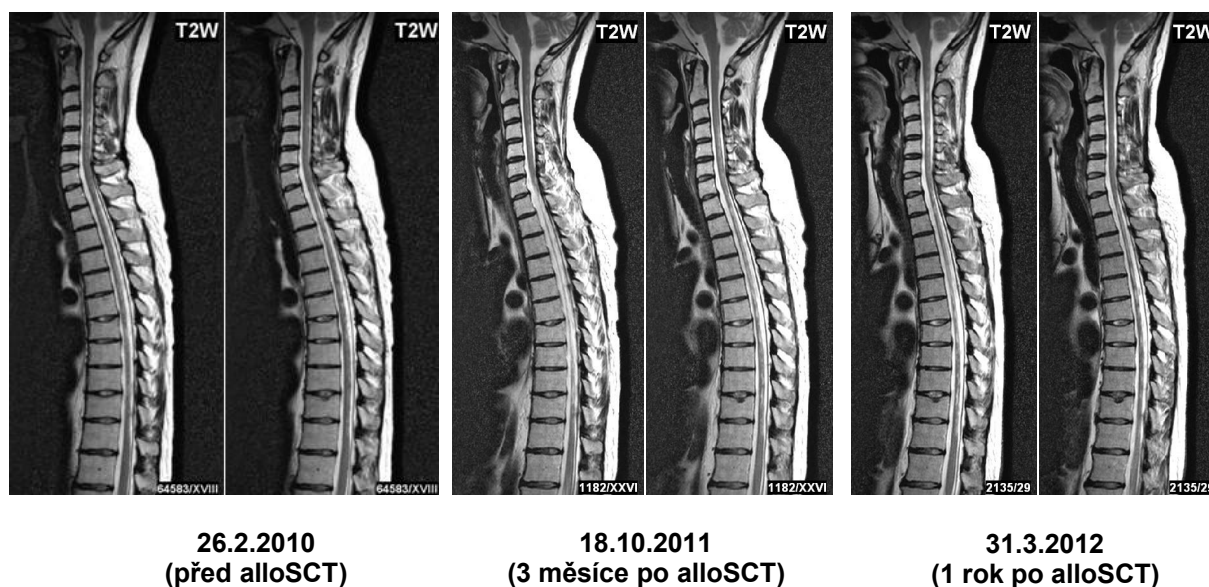
orálně (2001 - dosud) a od r. 2008 dosud pro dvě přechodná zhoršení paraparézy dolních končetin dále intravenózní imunoglobuliny v dávce 15 gramů jedenkrát měsíčně.

#### 4.4.2. Kazuistika pacientky s neuromyelitis optica léčené alloSCT

Léčba alloSCT byla u pacientky s NMO provedena v dubnu r. 2011. Akutní GvHD dosáhla stupně 2 (toxicita horní části zažívacího traktu, postižení kůže do 50% celkového tělesného povrchu a asymptomatická laboratorní elevace jaterních testů s normální hladinou bilirubinu). Při hodnocení v září 2012 pokračuje v profylaxi chronické GvHD cyklosporinem A orálně, dosud bez projevů chronické GvHD. Bylo dosaženo stabilních 100% chimerismu dárčovské krvetvorby.

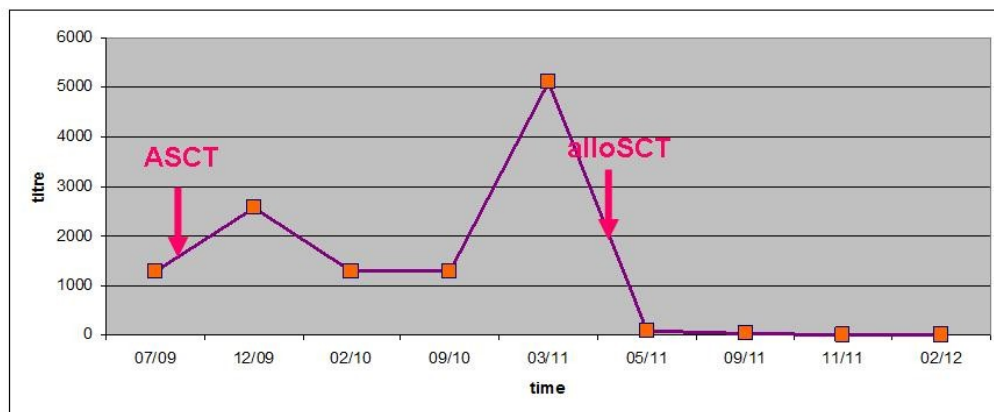
Neurologicky byla alloSCT provedena ve fázi vysoké frekvence relapsů NMO a při stupni EDSS 6,5. 18 měsíců po léčbě alloSCT zatím nedošlo k rozvoji nového relapsu NMO. Dochází průběžně ke zlepšování neurologického nálezu (aktuální stupeň EDSS 6,0) a mírné regresi a dále v čase stabilizaci nálezů na MR (Obr. č. 4). Poprvé od stanovení diagnózy NMO u této pacientky došlo k poklesům hodnot titrů NMO-IgG na neměřitelné hodnoty (Obr. č. 5). Z neurologického hlediska je pacientka po alloSCT dosud (říjen 2012) bez specifické NMO léčby.

Obr. č. 4.: Vývoj MR nálezů na míše (T2-vážený obraz) před a po alloSCT



(zapůjčeno prof. MUDr. Seidlem, DrSc., Radiodiagnostická klinika VFN a 1. LF UK v Praze)

Obr. č. 5.: Vývoj titrů protilátek NMO-IgG v krvi



## 5. DISKUZE

Roztroušená skleróza (RS) představuje chronické zánětlivé onemocnění centrálního nervového systému s prokázanou autoimunitní etiologií. Jedná se o nejčastější neurologickou příčinu mladých osob, u které dosud není znám lék, který by byl schopen onemocnění zcela vyléčit. Existující skupina léků využívaných v léčbě RS má pouze částečný efekt na snížení počtu a závažnosti akutních relapsů a oddálení progresivního stadia onemocnění s nárůstem trvalé invalidity. Léčba v tomto případě vede ke snížení aktivity autoimunitního zánětu a prevenci nebo alespoň snížení míry nevratné ztráty nervových vláken (neurodegenerace) v CNS. Zmíněná skupina dostupných léků zahrnuje dnes poměrně širokou škálu léků - počínaje kortikoidy, které jsou v léčbě RS využívány již přes čtvrt století, a stále představují lék volby v léčbě akutního relapsu, přes první biologické preparáty z 90. let (interferon beta a glatiramer acetát) až k fingolimodu a dosud nejúčinnější monoklonální protilátce natalizumabu. Své místo měly a mají také imunosupresiva a cytostatika, byť se jejich uplatnění posouvá u relabující formy onemocnění až na místo třetí a čtvrté volby, respektive mají své místo v léčbě progresivních forem RS. Zvláštní postavení pak má off-label léčba autologní transplantací kmenových buněk (ASCT) ve vzácnějších případech vysoce agresivního průběhu RS, který pozorujeme u zhruba 2-3% pacientů.

Byť je škála léků v současné době poměrně široká, bohužel máme stále velmi omezené možnosti správného výběru konkrétního léku pro individuálního pacienta – tzv. medicína „šitá na tělo“ pacientovi („tailored medicine“). S tím souvisí také obecně velmi malá schopnost predikovat prognózu dalšího průběhu choroby, která by umožnila zvolit adekvátní intenzitu léčby od stanovení diagnózy RS. Zatím se orientujeme především na základě klinických pozorování, kdy z prognostického hlediska je chápán jako nevýhodný vyšší věk v době počátku nemoci, mužské pohlaví, určitý charakter příznaků první ataky (sfinkterové, motorické a cerebelární obtíže) a polysymptomatický začátek, reziduum po prvním relapsu, krátký interval mezi relapsy a vyšší frekvence relapsů během prvních let onemocnění (Weinshenker, Bass et al. 1989; Confavreux, Vukusic et al. 2003; Bergamaschi 2006). Dalším prognosticky cenným ukazatelem je nález na magnetické rezonanci (MR) – konkrétně rozsah ložiskového postižení na vstupní MR (Fisniku, Brex et al. 2008).

Cíle práce zahrnovaly rozpoznání jednak potencionálně univerzálních imunologických ukazatelů prognózy RS, jednak vhodných klinických parametrů k výběru pacientů pro léčbu

autologní transplantací kmenových buněk v rámci zpracování dat skupiny takto léčených pacientů na našem pracovišti v průběhu deseti let (1998-2008).

Skupina pacientů s RS léčených ASCT zahrnovala celkem 26 pacientů sledovaných 5,5 let (medián), což představuje jednu z největších a nejdéle sledovaných skupin, jejichž data byla dosud publikována, přičemž celkový počet takto léčených pacientů celosvětově je odhadován na 400-500 pacientů (Mancardi a Saccardi 2008). V naší práci bylo dosaženo hodnoty základního ukazatele – intervalu bez progresu (progression free survival, PFS) – u celé skupiny 70,8% po třech letech od léčby ASCT. PFS však bylo výrazně nižší u celé skupiny po šesti letech sledování – 29,2%. Délky sledování šesti let dosáhlo z celkového počtu 26 pacientů ovšem pouze 13 pacientů, z toho 10 pacientů již v pokročilejší, sekundárně-progresivní fázi choroby. Naproti tomu pacienti s relabující (RR-RS) fází onemocnění, s kratším trváním RS a menším stupněm invalidity přispěli k úspěšnému výsledku tříletého sledování.

Vliv fáze a tíže onemocnění na výsledný efekt léčby ASCT byl dále analyzován na jednotlivých podskupinách pacientů. Zvoleny byly takové vstupní parametry, které již v předchozích pracích prokázaly určitý vliv na účinnost léčby ASCT – forma/fáze onemocnění (relabující versus progredující RS), neurologický stupeň invalidity hodnocený škálou EDSS, délka trvání onemocnění a věk pacientů při ASCT (Fassas, Passweg et al. 2002; Saccardi, Kozak et al. 2006). K získání dat od dostatečného počtu pacientů byl zvolen pro tuto analýzu tříletý interval sledování od léčby ASCT. Prokázali jsme, že krátké trvání onemocnění (do pěti let od prvních příznaků RS), nižší věk (do 35 let) a dosud relabující průběh onemocnění vedou k lepšímu výsledku léčby ASCT měřené ukazatelem PFS. Neprokázali jsme jednoznačný vliv stupně invalidity měřené na škále EDSS na účinek léčby ASCT, což bylo v minulosti publikováno (Burt, Cohen et al. 2003).

Zajímavá data z hlediska vlastní procedury léčby ASCT přineslo sledování postupu čištění štěpu (tzv. purging), které je prováděno s cílem eliminovat případné reziduální autoimunitní klony T-lymfocytů, které by mohly být separovány z těla pacienta společně s kmenovými buňkami. Štěp kmenových buněk lze obecně čistit ex vivo (tedy in vitro), případně lze za stejným účelem po převodu kmenových buněk podat pacientovi intravenózně anti-thymocytární imunoglobulin (ATG). Obě metody lze také uplatnit současně v rámci procedury ASCT u jednoho pacienta. Postup manipulace se štěpem byl změněn v průběhu desetiletého sledování skupiny na základě nových poznatků. Pacienti zahrnuti v počátečním období po r. 1998 obdrželi štěp čištěný in vitro (n=13), případně v kombinaci s podáním ATG (n=2). V r. 2006 publikovala European Group for Blood and Marrow Transplantation



(EBMT) informaci o zvýšeném riziku mortality ve spojení s dvojnásobným čištěním štěpu (in vitro + ATG) (Saccardi, Kozak et al. 2006). Proto po r. 2006 byl u všech pacientů v naší skupině (n=13) podán již pouze ATG a od čištění štěpu in vitro bylo upuštěno. Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl v klinickém účinku léčby ASCT mezi pacienty s a bez in vitro čištění štěpu. Tento výsledek je ve shodě s předchozí prací Fassase et al. (Fassas, Anagnostopoulos et al. 2000). Navíc Dubinsky et al. publikovali v r. 2009 data prokazující přítomnost perzistujících autoreaktivních klonů T-lymfocytů v periferní krvi pacientů s RS po ASCT i přes kompletní odstranění T-lymfocytů ze štěpu in vitro (Dubinsky, Burt et al. 2010). Tato fakta dále podporují doporučení neprovádět in vitro čištění štěpu v rámci procedury ASCT u pacientů s RS.

U naší skupiny pacientů byla vůbec poprvé zpracována podrobně léčba RS před a po ASCT. Zejména stran léčby RS po ASCT neexistují žádné relevantní studie nebo doporučení. Většina pacientů neměla žádnou specifickou léčbu RS v prvním roce po ASCT (Tabulka č. 6). Imunomodulační léčba byla zahájena v případě relapsu onemocnění nebo při progresi neurologického nálezu o  $\geq 0,5$  stupně EDSS škály. Odpovídající počet pacientů s relabující nebo progredující formou onemocnění byl po ASCT léčen imunodulačními léky, tedy tento faktor zásadně neovlivnil rozdílný průběh PFS křivek u obou skupin pacientů. Počet relapsů za rok (tzv. relapse-rate) byl statisticky významně snížen po ASCT u skupiny pacientů s relaps-remitentní RS. Případná léčba po ASCT zahrnovala stejné preparáty jako před léčbou ASCT, tedy vliv na snížení počtu relapsů lze jednoznačně připsat proceduře ASCT, která je chápána jako postup resetující imunitní systém. U žádného pacienta nebylo v prvních třech letech po ASCT nutno přistoupit k eskalaci léčby na pulzy cytostatik (cyklofosfamid, mitoxantron), nebo na již dostupnou monoklonální protilátku natalizumab.

U všech 26 pacientů byl v rámci procedury ASCT použit chemoterapeutický režim BEAM (BCNU=carmustin, etoposid, cytosin arabinosid a melfalan). Tento režim střední intenzity má prokazatelně nižší riziko mortality ve spojitosti s výkonem ASCT oproti léčbě režimy vysoké intenzity včetně celotělového ozáření (Burt, Marmont et al. 2006; Mancardi a Saccardi 2008). Mortalita spojená s výkonem (transplant related mortality, TRM – definována jako úmrtí do 100 dnů po ASCT) byla v našem souboru 0%. To je konzistentní s daty EBMT, která udává TRM při použití středně intenzivních chemoterapeutických režimů 0,9% (Mancardi 2007).

Časné nežádoucí účinky (v prvních 100 dnech od ASCT) v našem souboru zahrnovaly běžné a očekávané nežádoucí příhody ve spojitosti s mobilizací a chemoterapií (febrilní neutropenie, průjemy, infekce močových cest a mukozitida).

V rámci pozdních nežádoucích účinků byl zaznamenán jeden případ sekundárního autoimunitního onemocnění – získaného inhibitoru koagulačního faktoru VIII. U této pacientky došlo k rozvoji epistaxe a spontánních podkožních hematomů a sufusí 15 měsíců po ASCT. Byla prokázána přítomnost inhibitoru faktoru VIII a imunosupresivní terapií byla navozena remise této sekundární autoimunity. Získaná hemofilie představuje vzácné onemocnění s incidencí 1-1,5/milion obyvatel/rok (Huth-Kuhne, Baudo et al. 2009). Nejedná se o onemocnění běžně asociované s RS. Zde se však jedná o již druhý případ získané hemofilie u pacienta s RS po léčbě ASCT, přičemž první hlášená pacientka v řeckém centru vyvinula krvácivé komplikace 25 měsíců po ASCT a na tuto komplikaci zemřela (Kaloyannidis, Sakellari et al. 2004). Další dva případy byly popsány u pacientů se systémovým lupus erythematodes (SLE) taktéž po léčbě ASCT (Kaloyannidis, Sakellari et al. 2004). Je nutno tedy brát tuto potenciální, byť vzácnou komplikaci v úvahu.

Jednomu pacientovi z našeho souboru byla 39 měsíců po ASCT diagnostikována malignita – primární tumor CNS, glioblastoma multiforme. Na tuto komplikaci pacient zemřel 60 měsíců po ASCT. Riziko indukce malignity po použití středně intenzivních chemoterapeutických režimů je obecně velmi nízké (Gratwohl, Passweg et al. 2005; Saccardi, Kozak et al. 2006). Podle dosavadních znalostí nedáváme tuto malignitu do jednoznačné souvislosti s léčbou ASCT, vlastní RS nebo její předchozí imunosupresivní/cytostatickou léčbou, byť kombinaci všech uvedených imunosupresivních léčebných režimů jako rizikový faktor nemůžeme zcela vyloučit.

V práci byly dále popsány kazuistiky dvou pacientek s autoimunitním demyelinizačním onemocněním CNS, u nichž byla z různého důvodu provedena allogenní transplantace kmenových buněk. V prvním případě se jednalo o pacientku již v sekundárně progresivní fázi RS, která musela podstoupit léčbu alloSCT pro vedlejší diagnózu myelodysplastického syndromu. Kazuistiky obdobných pacientů již byly popsány v literatuře. Např. McAllister et al. popsali zlepšení objektivního neurologického nálezu a klinickou i MR stabilizaci jeden rok po provedení alloSCT pro vedlejší diagnózu chronické myeloidní leukémie u 46-leté ženy s relaps-remitentní RS, byť o skutečné fázi onemocnění je možno při udaném 29-letém průběhu onemocnění diskutovat (McAllister, Beatty et al. 1997). Předpokládaného pozitivního vlivu na stabilizaci autoimunitního onemocnění však nebylo dosaženo vždy, čehož je dokladem například kazuistika Jefferyho et al., kdy u pacientky se sekundárně progresivní RS s relapsy došlo již po šesti týdnech od provedení alloSCT z indikace chronické myeloidní leukémie k těžkému relapsu optické neuritis. Aktivita RS podpořená také nálezy na MR pak pokračovala v prvních dvou letech sledování po alloSCT

(Jeffery 2007). Naše pacientka byla léčena ablativním režimem (busulfan, cyklofosfamid), dárce kmenových buněk byl HLA shodný bratr pacientky. Léčba byla velmi dobře tolerována (bez známek akutní či chronické GvHD) a měla příznivý vliv na dlouhodobou (11 let sledování) stabilizaci RS.

Soubor 35 pacientů, kteří byli léčeni alloSCT pro samotné autoimunitní onemocnění, byl zpracován Daikelerem et al. (Daikeler, Hugle et al. 2009). Přes zjevnou nesourodost souboru (různá autoimunitní onemocnění, odlišné cytoredukční režimy různé intenzity, rozdíly v dárcích kmenových buněk, atd.) byla celkově zhodnocena efektivita léčby alloSCT u autoimunitních onemocnění jako nadějná: 55% pacientů dosáhlo kompletní remise základního onemocnění, u 23% pacientů byla zhodnocena alespoň částečná pozitivní odpověď na léčbu alloSCT. Pokud se podíváme na dostupná data v literatuře pouze ve vztahu k RS, jednalo se zatím o 10 pacientů léčených alloSCT včetně naší pacientky (Braendstrup, Langkilde et al. 2012; McAllister, Beatty et al. 1997; Mandalfino, Rice et al. 2000; La Nasa, Littera et al. 2004; Jeffery 2007; Daikeler, Hugle et al. 2009; Lu, Storek et al. 2009) - tři pacienti s RR-RS, čtyři pacienti s progresivní formou RS, u tří pacientů nebyla fáze onemocnění zaznamenána. Sedm pacientů bylo léčeno alloSCT pro hematologickou diagnózu, u tří byla primárním důvodem k léčbě samotná RS, z čehož vyplývá, že převažovalo využití ablativních režimů. Dárci kmenových buněk byli HLA identičtí sourozenci (n=6), HLA shodní sourozenci (n=3) nebo HLA shodný nepříbuzný dárcce (n=1). Ve vztahu k autoimunitnímu onemocnění bychom mohli logicky předpokládat, že větší efekt může být dosažen obnovou nepříbuzné dárce krevní skupiny. V jediném takovém případě však ke stabilizaci RS nedošlo (Lu, Storek et al. 2009). Všichni pacienti, u nichž byla primárním důvodem k alloSCT samotná RS, z léčby profitovali a dosáhli alespoň částečné stabilizace. Léčba byla relativně dobře tolerována. Z desíti pacientů bylo popsáno jedno úmrtí ve spojitosti s alloSCT, tedy 10% (adenovirová hepatitis, indikací k alloSCT byla v tomto případě chronická myeloidní leukémie). Akutní GvHD dosáhla u těchto pacientů maximálního stupně 2 (data dostupná u devíti pacientů). Chronická GvHD byla popsána jako extenzivní pouze u jednoho pacienta (alloSCT u indikace RS).

V této práci je dále popsána kazuistika pacientky s neuromyelitis optica, která byla léčena alloSCT po předchozím selhání veškeré konvenční léčby i autologní transplantace kmenových buněk. Jedná se o unikátní pacientku, protože podobný případ dosud nebyl publikován. U této pacientky je k dispozici 18-měsíční sledování po alloSCT léčbě a zatím lze statut její choroby označit za „disease free“, protože nedošlo k žádnému relapsu či progresi neurologického nálezu, nedošlo k progresi nálezu či známkám aktivity onemocnění na MR a

navíc došlo k vymizení patognomických protilátek IgG proti aquaporinu 4. Léčba alloSCT byla tolerována velmi dobře, u těžce pacientky dokonce lépe než léčba autologní transplantací. Pacientka je zajištěna profylaxí GvHD cyklosporinem, ale stran samotné NMO je od alloSCT bez specifické léčby. Na základě výsledků u této pacientky je možno také u NMO zvažovat léčbu alloSCT u nepříznivého a standardní léčbou nedostatečně ovlivnitelného průběhu onemocnění. V těchto případech se již výše uvedené riziko mortality spojené s výkonem blíží riziku úmrtí v souvislosti se samotným autoimunitním onemocněním. Z naší zkušenosti vyplývá doporučení k šetrnějšímu non-myeloablativnímu režimu a využití nepříbuzného, HLA shodného dárce.

Ve druhé části práce byly prospektivně studovány tři skupiny pacientů – 1. pacienti po první klinické atace suspektní z rozvoje demyelinizačního onemocnění typu RS (tzv. klinicky izolovaný syndrom, CIS); 2. pacienti s pokračující aktivitou RS i přes léčbu léky 1. volby indikovaní k léčbě natalizumabem; 3. pacienti s agresivním průběhem RS a selháním konvenční léčby indikovaní k léčbě ASCT. Záměrně byly zvoleny skupiny pacientů v různém stádiu onemocnění s cílem najít obecný ukazatel další prognózy RS bez ohledu na dosavadní průběh onemocnění. Výzkum zahrnoval imunologické parametry periferní krve (základní lymfocytární subpopulace a intracelulární cytokiny), protože toto vyšetření je z hlediska jak samotného pacienta tak z hlediska laboratorního a finančního relativně dobře dostupné. Imunologické vyšetření bylo společně s klinickým hodnocením (relapsy, progresse vyjádřená pomocí škály EDSS) provedeno před zahájením dlouhodobé léčby interferonem beta u CIS, natalizumabem nebo procedurou ASCT (první hodnocení provedeno ještě před mobilizací kmenových buněk). Další hodnocení pak bylo provedeno ve 3., 6., 12. a 24. měsíci od zahájení léčby.

Prvním výsledkem práce bylo konzistentní dvouleté sledování imunologických parametrů periferní krve. Podle našich znalostí se jedná o dosud jediné obdobné sledování zahrnující absolutní i procentuální hodnoty jednotlivých lymfocytárních subpopulací v intervalu sledování dvou let.

U skupiny pacientů léčených ASCT byla pozorována v souhlasu s předchozími pracemi imunitní rekonstituce. Dominovala dlouhodobá deplece CD4<sup>+</sup> lymfocytů, u nichž nedošlo k úplné úpravě na hodnoty před ASCT ani po 24 měsících sledování, a naopak velmi rychlá obnova CD8<sup>+</sup> lymfocytů a NK-buněk (Te Boekhorst, Lamers et al. 2006). V souladu s pozorováním u pacientů se SLE léčených ASCT (Alexander, Thiel et al. 2009) došlo u naší skupiny pacientů s RS rovněž k rychlé obnově B-lymfocytů na počty převyšující hodnoty

před ASCT včetně hodnot z 24. měsíce sledování. Podle Alexandra et al. (Alexander, Thiel et al. 2009) dochází po ASCT u SLE pacientů především k obnově naivních B-lymfocytů, zatímco obnovení paměťových B-lymfocytů je mnohem pomalejší. Tento fakt může být spojen s navozením autotolerance po léčbě ASCT.

U skupiny léčené natalizumabem byl pozorován nárůst počtu všech základních subpopulací v periferní krvi - CD4+, CD8+, CD19+ lymfocytů a NK-buněk. Ve shodě s dříve publikovanou prací Putzkiho et al. (Putzki, Baranwal et al. 2010) zvýšení počtu B-lymfocytů bylo doprovázeno relativním poklesem počtu CD4+ lymfocytů, což může být důležité pro další výzkum mechanismů účinku natalizumabu i jeho bezpečnosti, především ve vztahu k možné komplikaci virové oportunní infekci progresivní multifokální leukoencefalopatií.

U skupiny pacientů s CIS nebyly nalezeny v průběhu léčby interferonem beta signifikantní změny v lymfocytárních subpopulacích. To může být vysvětleno efektem léku především na funkci nikoli absolutní počet jednotlivých imunitních buněk (Billiau, Kieseier et al. 2004; Zafranskaya, Oschmann et al. 2007).

V rámci hledání prediktivního imunologického ukazatele jsme se soustředili na statistické vyhodnocení parametrů získaných souhrnně u pacientů všech tří skupin před léčbou a ve 3. a 6. měsíci léčby ve vztahu k přítomnosti relapsů a progresi v průběhu dvouletého sledování. Zvoleny byly právě hodnoty před léčbou a v prvních měsících léčby, protože to je optimální doba k hodnocení prognózy s možností přizpůsobení intenzity terapie. Po delším intervalu léčby (1 rok a více) již prognózu hodnotíme mnohem více podle klinického vývoje a případné imunologické prediktivní faktory by v tomto období již zásadní posun v současné praxi nepřinesly.

Popsali jsme statisticky významnou korelaci mezi absolutním počtem CD19+ B-lymfocytů v periferní krvi před zahájením léčby (všechny tři skupiny dohromady) a progresí invalidity měřenou pomocí zhoršení na škále EDSS v průběhu dvouletého sledování. Vyšší statistické významnosti bylo možno dosáhnout spojením vstupní hodnoty CD19+ lymfocytů a CD3+ lymfocytů 3 měsíce po zahájení léčby. Obdobná statisticky významná korelace byla popsána dále u několika parametrů v šestém měsíci léčby (procentuální hodnota CD3+, CD19+ a CD5+ lymfocytů, absolutní hodnota CD3+, CD4+ a CD8+ lymfocytů), nicméně vzhledem ke snaze predikovat průběh onemocnění co nejdříve na počátku nebo optimálně ještě před zahájením léčby jsme se dále věnovali především parametru CD19+ lymfocytů.

Neprokázali jsme žádnou statisticky významnou korelaci mezi zvolenými imunologickými parametry a aktivitou RS hodnocenou podle přítomnosti relapsu v průběhu dvouletého sledování.

U absolutní hodnoty CD19+ lymfocytů před zahájením léčby jsme byli schopni určit prahovou hodnotu ve výši 0,2, která odlišuje pacienty s progresí a bez progresy v následujících dvou letech léčby, a to se sensitivitou 81% a specificitou 46%.

V patofyziologii autoimunitního zánětu byly stavěny u RS do popředí řadu let výhradně T-lymfocyty. Dlouho je však popisována také přítomnost B-lymfocytů a plazmatických buněk v lézích RS (Prineas a Wright 1978; Esiri 1980; Baranzini, Jeong et al. 1999) a produkty těchto buněk - oligoklonální pásy – jsou využívány přes 20 let v diagnostice RS. B-lymfocyty byly prokázány dále v ektopických folikulech na meningách pacientů s RS (Magliozzi, Howell et al. 2007). Přítomnost této aberantní lymfatické tkáně korelovala s patologií kortikální šedé hmoty mozku, s dobou do progresy onemocnění, s dobou do dosažení stupně invalidity s upoutáním pacienta na vozík, a s věkem v době úmrtí (Howell, Reeves et al. 2011).

Úloha B-lymfocytů a plazmatických buněk u RS zahrnuje zejména prezentaci antigenu T-lymfocytům, produkci myelin-specifických protilátek s destrukcí myelinu a cytokinovou prozánětlivou produkci (Reindl, Kuenz et al. 2010).

Jednoznačně pak roli B-lymfocytů v autoimunitním procesu RS potvrdila také statisticky významná účinnost humanizované monoklonální protilátky proti povrchovému antigenu B-buněk CD20 ocrelizumabu ve fázi II klinického zkoušení u RR-RS na snížení počtu relapsů onemocnění a aktivních lézí na MR (Kappos, Li et al. 2011).

V naší práci koreloval vyšší počet B-lymfocytů v periferní krvi před léčbou (souhrnné zpracování pacientů v různém stadiu onemocnění a před jedním ze tří různých druhů léčby) s lepším klinickým statusem vyjádřeným pomocí progresy invalidity v následujících dvou letech sledování. Práce nebyla zaměřena na etiopatogenetické vysvětlení tohoto fenoménu, nicméně je možno diskutovat příčiny této prognosticky příznivé role vyššího počtu B-lymfocytů periferní krve u pacientů s RS.

Hypoteticky by vyšší počet B-lymfocytů mohl znamenat aktivní zánětlivou fázi onemocnění, u které převažuje autoimunitní zánět nad irreverzibilní neurodegenerací. V takovém případě lze očekávat efektivitu protizánětlivých/imunomodulačních léčebných postupů včetně vlivu na oddálení progresy invalidity. Nicméně této zjednodušené představě neodpovídal fakt, že ani jeden ze zvolených léků nevedl k dlouhodobé redukci počtu B-lymfocytů v periferní krvi. Navíc průměrná délka trvání onemocnění deset let u ASCT skupiny a šest let u natalizumabové skupiny při zahájení léčby rovněž vede k pochybnostem o plně zánětlivé fázi choroby bez vlivu neurodegenerace.

Do úvahy přichází dále přesun B-lymfocytů do kompartmentu periferní krve s naopak relativně malým zastoupením těchto zánětlivých buněk v kompartmentu likvoru a tím celého CNS. Recentně byla publikována práce, která prokázala spojitost mezi vynikající odpovědí na léčbu natalizumabem (tito pacienti dosáhli již zmíněného statutu „disease free“) a nižším počtem B-lymfocytů a produkcí IgM a částečně i IgG v likvoru pacientů s RR-RS (Villar, Garcia-Sanchez et al. 2012). V naší práci nebylo zkoumáno zastoupení jednotlivých subpopulací v likvoru, tedy se blíže nemůžeme k zastoupení B-lymfocytů v kompartmentu CNS vyjádřit. Nicméně u všech pacientů byly před zahájením léčby vyšetřeny oligoklonální pásy v likvoru (data v práci neuvedena) a nebyl pozorován žádný vztah k počtům B-lymfocytů v periferní krvi.

Teoreticky lze zvažovat i podíl protizánětlivých, interleukin 10 produkujících B-lymfocytů (regulačních B-buněk) na celkově zvýšeném počtu buněk této subpopulace v periferní krvi u pacientů s lepší prognózou ve vztahu k progresi invalidity v následujících dvou letech (Fillatreau, Gray et al. 2008).

Závěrem naše výsledky potvrdily úvodní hypotézu, že využití základních imunologických parametrů periferní krve, které jsou relativně dobře dostupné, může přispět k predikci dalšího vývoje roztroušené sklerózy.

## 6. ZÁVĚR

Vytyčené cíle disertační práce zahrnovaly výzkum a zjištění možného prognostického využití imunologických ukazatelů periferní krve u pacientů v různých stádiích roztroušené sklerózy a s různými léčebnými přístupy. Výsledky práce lze shrnout do dvou základních oblastí:

1. byla zpracována desetiletá klinická data pacientů s agresivním průběhem RS, u nichž selhaly konvenční postupy léčby, a kteří byli léčeni off-label vysokodávkovanou imunoablací s podporou autologních kmenových buněk. Vzhledem k velikosti souboru (26 pacientů z celkového odhadovaného počtu 400-500 takto léčených pacientů celosvětově) a délce sledování (medián 5,5 let) se jedná o unikátní data. Bylo dosaženo tříletého intervalu bez progresu 70,8% a šestiletého intervalu bez progresu 29,2%. Z výsledků byla definována skupina pacientů, u které lze předpokládat profit z uvedené léčby – pacienti s délkou trvání choroby do pěti let, do 35 let věku a s ještě relabujícím průběhem RS, u nichž převažuje zánětlivý proces nad irreverzibilní neurodegenerací.

Zároveň byly zpracovány kazuistiky dvou pacientek s demyelinizačním onemocněním CNS, které profitovaly z léčby allogenní transplantací kmenových buněk. V případě onemocnění neuromyelitis optica jako primární indikace k této léčbě se jedná o dosažení unikátní stabilizace agresivního autoimunitního onemocnění klinicky, dle rezonančního a laboratorního sledování. Léčba byla v obou případech dobře tolerována a může být do budoucna vzata do úvahy u autoimunitních onemocnění CNS s nepříznivým průběhem a selháním standardní léčby.

2. byl dokumentován vývoj lymfocytárních subpopulací v absolutních i procentuálních hodnotách v průběhu dvouletého sledování u tří skupin pacientů s demyelinizačním onemocněním (klinicky izolovaný syndrom léčený interferonem beta, RS léčená natalizumabem nebo autologní transplantací kmenových buněk). Statistickým zpracováním získaných imunologických parametrů periferní krve byl nalezen možný prediktivní faktor klinické progresu onemocnění v následujících dvou letech – absolutní hodnota CD19+ B-lymfocytů před zahájením terapie respektive kombinace vstupní absolutní hodnoty CD19+ lymfocytů s procentuální hodnotou CD3+ lymfocytů ve 3. měsíci od zahájení terapie. Prediktivní hodnota těchto imunologických faktorů musí být samozřejmě ověřena na velkých populacích pacientů, nicméně práce jednoznačně prokázala, že sledování základních



lymfocytárních subpopulací periferní krve u pacientů s RS má svůj význam a je hodno dalšího výzkumu. Ten by měl zahrnovat také podrobnější poznání jednotlivých podtypů B-lymfocytů a jejich funkcí, a to v periferní krvi i v mozkomíšním moku. Důležité do budoucna bude také déletrvající sledování klinického vývoje onemocnění včetně sledování aktivity RS pomocí MR ve vztahu k imunologickým parametrům.

## 7. LITERATURA

1. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1993;43(4):655-61.
2. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. *Lancet* 1998;352(9139):1498-504.
3. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* 1999;53(3):457-65.
4. Abbas A, Lichtman A. *Cellular and Molecular Immunology*, Elsevier Saunders 2005.
5. Adachi K, Kumamoto T, et al. Elevated soluble interleukin-2 receptor levels in patients with active multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1990;28(5):687-91.
6. Adorini L, Penna G, et al. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *J Cell Biochem* 2003;88(2):227-33.
7. Achiron A, Kishner I, et al. Intravenous immunoglobulin treatment following the first demyelinating event suggestive of multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arch Neurol* 2004;61(10):1515-20.
8. Alexander T, Thiel A, et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood* 2009;113(1):214-23.
9. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 2007;61(4):288-99.
10. Bagaeva LV, Williams LP, et al. IL-12 dependent/IFN gamma independent expression of CCR5 by myelin-reactive T cells correlates with encephalitogenicity. *J Neuroimmunol* 2003;137(1-2):109-16.
11. Bach MA, Martin C, et al. T cell subsets in multiple sclerosis. A longitudinal study of exacerbating-remitting cases. *J Neuroimmunol* 1985;7(5-6):331-43.
12. Baranzini SE, Jeong MC, et al. B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *J Immunol* 1999;163(9):5133-44.
13. Benczur M, Petrányl GG, et al. Dysfunction of natural killer cells in multiple sclerosis: a possible pathogenetic factor. *Clin Exp Immunol* 1980;39(3):657-62.
14. Bergamaschi R. Prognosis of multiple sclerosis: clinical factors predicting the late evolution for an early treatment decision. *Expert Rev Neurother* 2006;6(3):357-64.
15. Berger T, Rubner P, et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 2003;349(2):139-45.
16. Bielekova B, Catalfamo M, et al. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(15):5941-6.
17. Bielekova B, Martin R. Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain* 2004;127(Pt 7):1463-78.
18. Billiau A, Kieseier BC, et al. Biologic role of interferon beta in multiple sclerosis. *J Neurol* 251 2004;Suppl 2:II10-4.

19. Bitsch A, Kuhlmann T, et al. Tumour necrosis factor alpha mRNA expression in early multiple sclerosis lesions: correlation with demyelinating activity and oligodendrocyte pathology. *Glia* 2000;29(4):366-75.
20. Bizzoco E, Lolli F, et al. Prevalence of neuromyelitis optica spectrum disorder and phenotype distribution. *J Neurol* 2009;256(11):1891-8.
21. Bongioanni P, Fioretti C, et al. Lymphocyte subsets in multiple sclerosis. A study with two-colour fluorescence analysis. *J Neurol Sci* 1996;139(1):71-7.
22. Bonig H, Wundes A, et al. Increased numbers of circulating hematopoietic stem/progenitor cells are chronically maintained in patients treated with the CD49d blocking antibody natalizumab. *Blood* 2008;111(7):3439-41.
23. Bouaziz JD, Yanaba K, et al. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol Rev* 2008;224:201-14.
24. Braendstrup P, Langkilde AR, et al. Progression and CSF Inflammation after Eradication of Oligoclonal Bands in an MS Patient Treated with Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Follicular Lymphoma. *Case Rep Neurol* 2012;4(2):101-6.
25. Bray PF, Bloomer LC, et al. Epstein-Barr virus infection and antibody synthesis in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1983;40(7):406-8.
26. Breij EC, Brink BP, et al. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2008;63(1):16-25.
27. Burt RK, Cohen BA, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: failure of a total body irradiation-based conditioning regimen to prevent disease progression in patients with high disability scores. *Blood* 2003;102(7):2373-8.
28. Burt RK, Marmont A, et al. Randomized controlled trials of autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: the evolution from myeloablative to lymphoablative transplant regimens. *Arthritis Rheum* 2006;54(12):3750-60.
29. Burt RK, Padilla J, et al. Effect of disease stage on clinical outcome after syngeneic bone marrow transplantation for relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* 1998;91(7):2609-16.
30. Castro RF, Jackson KA, et al. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science* 2002;297(5585):1299.
31. Cepok S, Jacobsen M, et al. Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain* 2001;124(Pt 11):2169-76.
32. Clerici M, Saresella M, et al. Single-cell analysis of cytokine production shows different immune profiles in multiple sclerosis patients with active or quiescent disease. *J Neuroimmunol* 2001;121(1-2):88-101.
33. Cohen JA, Barkhof F, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010;362(5):402-15.
34. Comi G, Martinelli V, et al. Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2009;374(9700):1503-11.
35. Compston A. Lymphocyte subpopulations in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1983;46(2):105-14.
36. Compston A. *McAlpine's Multiple Sclerosis*, Churchill Livingstone Elsevier 2006.
37. Confavreux C, Compston DA, et al. EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55(8):671-6.
38. Confavreux C, Vukusic S, et al. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain* 2003;126(Pt 4):770-82.

39. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2006;354(17):1813-26.
40. Daikeler T, Hugle T, et al. Allogeneic hematopoietic SCT for patients with autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant* 2009;44(1):27-33.
41. Dalbeth N, Gundle R, et al. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol* 2004;173(10):6418-26.
42. Dalloul A. CD5: a safeguard against autoimmunity and a shield for cancer cells. *Autoimmun Rev* 2009;8(4):349-53.
43. De Jager PL, Rossin E, et al. Cytometric profiling in multiple sclerosis uncovers patient population structure and a reduction of CD8low cells. *Brain* 2008;131(Pt 7):1701-11.
44. de Kleer I, Vastert B, et al. Autologous stem cell transplantation for autoimmunity induces immunologic self-tolerance by reprogramming autoreactive T cells and restoring the CD4+CD25+ immune regulatory network. *Blood* 2006;107(4):1696-702.
45. Deshpande P, King IL, et al. IL-12 driven upregulation of P-selectin ligand on myelin-specific T cells is a critical step in an animal model of autoimmune demyelination. *J Neuroimmunol* 2006;173(1-2):35-44.
46. Dubinsky AN, Burt RK, et al. T-cell clones persisting in the circulation after autologous hematopoietic SCT are undetectable in the peripheral CD34+ selected graft. *Bone Marrow Transplant* 2010;45(2):325-31.
47. Ebers GC. A twin consensus in MS. *Mult Scler* 2005;11(5):497-9.
48. Epstein S, Stern PH, et al. Evidence for abnormal regulation of circulating 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D in patients with pulmonary tuberculosis and normal calcium metabolism. *Calcif Tissue Int* 1984;36(5):541-4.
49. Esiri MM. Multiple sclerosis: a quantitative and qualitative study of immunoglobulin-containing cells in the central nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1980;6(1):9-21.
50. Evangelou N, Jackson M, et al. Association of the APOE epsilon4 allele with disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;67(2):203-5.
51. Fassas A, Anagnostopoulos A, et al. Autologous stem cell transplantation in progressive multiple sclerosis--an interim analysis of efficacy. *J Clin Immunol* 2000;20(1):24-30.
52. Fassas A, Anagnostopoulos A, et al. Peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of progressive multiple sclerosis: first results of a pilot study. *Bone Marrow Transplant* 1997;20(8):631-8.
53. Fassas A, Mancardi GL. Autologous hemopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: is it worthwhile? *Autoimmunity* 2008;41(8):601-10.
54. Fassas A, Passweg JR, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. A retrospective multicenter study. *J Neurol* 2002;249(8):1088-97.
55. Fazekas F, Strasser-Fuchs S, et al. Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with rapid progression of multiple sclerosis. *Neurology* 2001;57(5):853-7.
56. Filion LG, Matusevicius D, et al. Monocyte-derived IL12, CD86 (B7-2) and CD40L expression in relapsing and progressive multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2003;106(2):127-38.
57. Fillatreau S, Gray D, et al. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol* 2008;8(5):391-7.
58. Fillatreau S, Sweenie CH, et al. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 2002;3(10):944-50.
59. Fisher E, Lee JC, et al. Gray matter atrophy in multiple sclerosis: a longitudinal study. *Ann Neurol* 2008;64(3):255-65.

60. Fisniku LK, Brex PA, et al. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain* 2008;131(Pt 3):808-17.
61. Fletcher JM, Lonergan R, et al. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol* 2009;183(11):7602-10.
62. Franciotta D, Zardini E, et al. Interferon-gamma and interleukin-4-producing T cells in peripheral blood of multiple sclerosis patients. *Eur Cytokine Netw* 2000;11(4):677-81.
63. Frisullo G, Nociti V, et al. IL17 and IFNgamma production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. *Cytokine* 2008;44(1):22-5.
64. Galetta KM, Calabresi PA, et al. Optical coherence tomography (OCT): imaging the visual pathway as a model for neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 2011;8(1):117-32.
65. Gallo P, Piccinno M, et al. Interleukin-2 levels in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 1988;24(6):795-7.
66. Gandhi R, Laroni A, et al. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2010;221(1-2):7-14.
67. Ghezzi A, Zaffaroni M, et al. Evaluation of evoked potentials and lymphocyte subsets as possible markers of multiple sclerosis: one year follow up of 30 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1986;49(8):913-9.
68. Giovannoni G, Silver NC, et al. Immunological time-course of gadolinium-enhancing MRI lesions in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 2000;44(4):222-8.
69. Gratwohl A, Passweg J, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant* 2005;35(9):869-79.
70. Haahr S, Hollsberg P. Multiple sclerosis is linked to Epstein-Barr virus infection. *Rev Med Virol* 2006;16(5):297-310.
71. Haahr S, Koch-Henriksen N, et al. Increased risk of multiple sclerosis after late Epstein-Barr virus infection: a historical prospective study. *Mult Scler* 1995;1(2):73-7.
72. Haas J, Fritzsche B, et al. Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol* 2007;179(2):1322-30.
73. Hafler DA, Compston A, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007;357(9):851-62.
74. Handel AE, Williamson AJ, et al. Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *PLoS One* 2011;6(1):e16149.
75. Hauser SL, Ault KA, et al. Natural killer cell activity in multiple sclerosis. *J Immunol* 1981;127(3):1114-7.
76. Havrdova E. *Neuroimmunologie*, Maxdorf 2001.
77. Havrdova E, Galetta S, et al. Effect of natalizumab on clinical and radiological disease activity in multiple sclerosis: a retrospective analysis of the Natalizumab Safety and Efficacy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (AFFIRM) study. *Lancet Neurol* 2009;8(3):254-60.
78. Hayes CE, Cantorna MT, et al. Vitamin D and multiple sclerosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;216(1):21-7.
79. He YW, Malek TR. Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. *J Exp Med* 1996;184(1):289-93.
80. Healy BC, Ali EN, et al. Smoking and disease progression in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009;66(7):858-64.
81. Hedstrom AK, Baarnhielm M, et al. Exposure to environmental tobacco smoke is associated with increased risk for multiple sclerosis. *Mult Scler* 2011;17(7):788-93.

82. Hensiek AE, Seaman SR, et al. Familial effects on the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology* 2007;68(5):376-83.
83. Hickey WF. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1991;1(2):97-105.
84. Hirotani M, Niino M, et al. Decreased IL-10 production mediated by Toll-like receptor 9 in B cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2010;221(1-2):95-100.
85. Hofman FM, Hinton DR, et al. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 1989;170(2):607-12.
86. Hofman FM, von Hanwehr RI, et al. Immunoregulatory molecules and IL 2 receptors identified in multiple sclerosis brain. *J Immunol* 1986;136(9):3239-45.
87. Hořejší V, Bartůňková J. *Základy imunologie*, Triton 2005.
88. Howell OW, Reeves CA, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain* 2011;134(Pt 9):2755-71.
89. Hulshof S, Montagne L, et al. Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions. *Glia* 2002;38(1):24-35.
90. Huth-Kuhne A, Baudo F, et al. International recommendations on the diagnosis and treatment of patients with acquired hemophilia A. *Haematologica* 2009;94(4):566-75.
91. Chang JH, Cha HR, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the differentiation and migration of T(H)17 cells to protect against experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 2010;5(9):e12925.
92. Ikehara S, Good RA, et al. Rationale for bone marrow transplantation in the treatment of autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(8):2483-7.
93. ROC analysis: web-based calculator for ROC curves. from <http://www.jrocf.org>. (2006 May 17)
94. Jacobs LD, Cookfair DL, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 1996;39(3):285-94.
95. Jeffery DR. Failure of allogeneic bone marrow transplantation to arrest disease activity in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2007;13(8):1071-5.
96. Jersild C, Svejgaard A, et al. HLA antigens and multiple sclerosis. *Lancet* 1972;1:1240-1241.
97. Johnson KP, Brooks BR, et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1995;45(7):1268-76.
98. Kaloyannidis P, Sakellari I, et al. Acquired hemophilia-A in a patient with multiple sclerosis treated with autologous hematopoietic stem cell transplantation and interferon beta-1a. *Bone Marrow Transplant* 2004;34(2):187-8.
99. Kappos L, Bates D, et al. Natalizumab treatment for multiple sclerosis: updated recommendations for patient selection and monitoring. *Lancet Neurol* 2011;10(8):745-58.
100. Kappos L, Li D, et al. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* 2011;378(9805):1779-87.
101. Kappos L, Polman CH, et al. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 2006;67(7):1242-9.
102. Karussis DM, Slavin S, et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis and induction of tolerance with acute immunosuppression followed by syngeneic bone marrow transplantation. *J Immunol* 1992;148(6):1693-8.

103. Kastrukoff LF, Morgan NG, et al. A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1998;86(2):123-33.
104. Killestein J, Kalkers NF, et al. TNFalpha production by CD4(+) T cells predicts long-term increase in lesion load on MRI in MS. *Neurology* 2001;57(6):1129-31.
105. Killestein J, Rep MH, et al. Active MRI lesion appearance in MS patients is preceded by fluctuations in circulating T-helper 1 and 2 cells. *J Neuroimmunol* 2001;118(2):286-94.
106. Kivisakk P, Healy BC, et al. Natalizumab treatment is associated with peripheral sequestration of proinflammatory T cells. *Neurology* 2009;72(22):1922-30.
107. Komiyama Y, Nakae S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006;177(1):566-73.
108. Kozak T, Havrdova E, et al. High-dose immunosuppressive therapy with PBPC support in the treatment of poor risk multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant* 2000;25(5):525-31.
109. Krasulová E. Léčba roztroušené sklerózy - současnost a trendy do budoucna. *Postgrad Med* 2011;13(1):91-96.
110. Kreuzfelder E, Shen G, et al. Enumeration of T, B and natural killer peripheral blood cells of patients with multiple sclerosis and controls. *Eur Neurol* 1992;32(4):190-4.
111. Krumbholz M, Meinl I, et al. Natalizumab disproportionately increases circulating pre-B and B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 2008;71(17):1350-4.
112. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33(11):1444-52.
113. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 2005;128(Pt 11):2705-12.
114. La Nasa G, Littera R, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a patient affected by large granular lymphocyte leukemia and multiple sclerosis. *Ann Hematol* 2004;83(6):403-5.
115. Leonard JP, Waldburger KE, et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J Exp Med* 1995;181(1):381-6.
116. Lock C, Hermans G, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 2002;8(5):500-8.
117. Longbrake EE, Racke MK. Why did IL-12/IL-23 antibody therapy fail in multiple sclerosis? *Expert Rev Neurother* 2009;9(3):319-21.
118. Lu JQ, Storek J, et al. Continued disease activity in a patient with multiple sclerosis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Arch Neurol* 2009;66(1):116-20.
119. Lunemann A, Tackenberg B, et al. Impaired IFN-gamma production and proliferation of NK cells in multiple sclerosis. *Int Immunol* 2011;23(2):139-48.
120. Magliozzi R, Howell O, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 2007;130(Pt 4):1089-104.
121. Mancardi G. Present status of HSCT in MS. *Mult Scler* 2007;13(Suppl. 2):S22.
122. Mancardi G, Saccardi R. Autologous haematopoietic stem-cell transplantation in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008;7(7):626-36.
123. Mancardi GL, Saccardi R, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses Gd-enhanced MRI activity in MS. *Neurology* 2001;57(1):62-8.
124. Mandalfino P, Rice G, et al. Bone marrow transplantation in multiple sclerosis. *J Neurol* 200;247(9):691-5.
125. Marmont AM, Gualandi F, et al. Catastrophic relapse of Evans syndrome five years after allogeneic BMT notwithstanding full donor chimerism. Terminal hemolytic-uremic syndrome. *Autoimmunity* 2006;39(6):505-11.

126. Martin R, Jaraquemada D, et al. Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J Immunol* 1990;145(2):540-8.
127. Martyn CN, Cruddas M, et al. Symptomatic Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993;56(2):167-8.
128. Matiello M, Pittock SJ, et al. Failure of autologous hematopoietic stem cell transplantation to prevent relapse of neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 2011;68(7):953-5.
129. Mayne CG, Spanier JA, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 acts directly on the T lymphocyte vitamin D receptor to inhibit experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 2011;41(3):822-32.
130. McAllister LD, Beatty PG, et al. Allogeneic bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia in a patient with multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant* 1997;19(4):395-7.
131. McDonald WI, Compston A, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50(1):121-7.
132. Medana I, Martinic MA, et al. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 2001;159(3):809-15.
133. Mezey E, Key S, et al. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(3):1364-9.
134. Miniero R, Tardivo I, et al. Outcome of pregnancy after organ transplantation: a retrospective survey in Italy. *Transpl Int* 2005;17(11):724-9.
135. Mirowska D, Skierski J, et al. Changes of percentages in immune cells phenotypes and cytokines production during two-year IFN-beta-1a treatment in multiple sclerosis patients. *J Neurol* 2003;250(10):1229-36.
136. Mix E, Olsson T, et al. B cells expressing CD5 are increased in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1990;79(1):21-7.
137. Montalban X, Tintore M, et al. MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 2010;74(5):427-34.
138. Mosmann TR, Cherwinski H, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348-57.
139. Muraro PA, Douek DC, et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J Exp Med* 2005;201(5):805-16.
140. Muraro PA, Pette M, et al. Human autoreactive CD4+ T cells from naive CD45RA+ and memory CD45RO+ subsets differ with respect to epitope specificity and functional antigen avidity. *J Immunol* 2000;164(10):5474-81.
141. Nash RA, Bowen JD, et al. High-dose immunosuppressive therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for severe multiple sclerosis. *Blood* 2003;102(7):2364-72.
142. O'Keefe J, Gately CM, et al. T-cells expressing natural killer (NK) receptors are altered in multiple sclerosis and responses to alpha-galactosylceramide are impaired. *J Neurol Sci* 2008;275(1-2):22-8.
143. Olerup O, Hillert J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 1991;38(1):1-15.
144. Olerup O, Olsson R, et al. HLA-DR and HLA-DQ are not markers for rapid disease progression in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 1995;108(3):870-8.



145. Onozaki K. Etiological and biological aspects of cigarette smoking in rheumatoid arthritis. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009;8(5):364-8.
146. Palacios N, Alonso A, et al. Smoking and increased risk of multiple sclerosis: parallel trends in the sex ratio reinforce the evidence. *Ann Epidemiol* 2011;21(7):536-42.
147. Panitch HS, Hirsch RL, et al. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 1987;37(7):1097-102.
148. Pasquini MC, Voltarelli J, et al. Transplantation for Autoimmune Diseases in North and South America: A Report of the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012 Oct;18(10):1471-8.
149. Paty DW, Li DK. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1993;43(4):662-7.
150. Peelen E, Knippenberg S, et al. Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system: A review. *Autoimmun Rev* 2011 Oct;10(12):733-43.
151. Peng F, Qiu W, et al. A preliminary result of treatment of neuromyelitis optica with autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation. *Neurologist* 2010;16(6):375-8.
152. Petereit HF, Pukrop R, et al. Low interleukin-10 production is associated with higher disability and MRI lesion load in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2003;206(2):209-14.
153. Pette M, Fujita K, et al. Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology* 1990;40(11):1770-6.
154. Polman CH, Reingold SC, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69(2):292-302.
155. Polman CH, Reingold SC, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005;58(6):840-6.
156. Ponomarev ED, Maresz K, et al. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *J Neurosci* 2007;27(40):10714-21.
157. Portaccio E, Goretti B, et al. APOE-epsilon4 is not associated with cognitive impairment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009;15(12):1489-94.
158. Poser CM, Paty DW, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13(3):227-31.
159. Prineas JW, Wright RG. Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Lab Invest* 1978;38(4):409-21.
160. Putzki N, Baranwal MK, et al. Effects of natalizumab on circulating B cells, T regulatory cells and natural killer cells. *Eur Neurol* 2010;63(5):311-7.
161. Ramagopalan SV, Knight JC, et al. Multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. *Curr Opin Neurol* 2009;22(3):219-25.
162. Rasmussen S, Wang Y, et al. Persistent activation of microglia is associated with neuronal dysfunction of callosal projecting pathways and multiple sclerosis-like lesions in relapsing--remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 2007;130(Pt 11):2816-29.
163. Ratchford JN, Quigg ME, et al. Optical coherence tomography helps differentiate neuromyelitis optica and MS optic neuropathies. *Neurology* 2009;73(4):302-8.
164. Reindl M, Kuenz B, et al. B cells and antibodies in MS. *Results Probl Cell Differ* 2010;51:99-113.

165. Richert JR, Robinson ED, et al. Human cytotoxic T-cell recognition of a synthetic peptide of myelin basic protein. *Ann Neurol* 1989;26(3):342-6.
166. Rook GA, Steele J, et al. Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Immunology* 1986;57(1):159-63.
167. Sabater L, Giral A, et al. Cytotoxic effect of neuromyelitis optica antibody (NMO-IgG) to astrocytes: an in vitro study. *J Neuroimmunol* 2009;215(1-2):31-5.
168. Saccardi R, Kozak T, et al. Autologous stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: update of the European Group for Blood and Marrow Transplantation autoimmune diseases working party database. *Mult Scler* 2006;12(6):814-23.
169. Saiz A, Blanco Y, et al. Clinical outcome 6 years after autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple sclerosis. *Neurologia* 2008;23(7):405-7.
170. Saiz A, Blanco Y, et al. Clinical and MRI outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation in MS. *Neurology* 2004;62(2):282-4.
171. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6(4):345-52.
172. Santoli D, Hall W, et al. Cytotoxic activity and interferon production by lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J Immunol* 1981;126(4):1274-8.
173. Saraste M, Irjala H, et al. Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol Sci* 2007;28(3):121-6.
174. Scolozzi R, Boccafogli A, et al. T-cell phenotypic profiles in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 1992;108(1):93-8.
175. Seidi OA, Semra YK, et al. Expression of CD5 on B lymphocytes correlates with disease activity in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2002;133(1-2):205-10.
176. Sellebjerg F, Barnes D, et al. EFNS guideline on treatment of multiple sclerosis relapses: report of an EFNS task force on treatment of multiple sclerosis relapses. *Eur J Neurol* 2005;12(12):939-46.
177. Sellner J, Boggild M, et al. EFNS guidelines on diagnosis and management of neuromyelitis optica. *Eur J Neurol* 2010;17(8):1019-32.
178. Selmaj K, Raine CS, et al. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest* 1991;87(3):949-54.
179. Selmaj K, Raine CS, et al. Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. *Ann Neurol* 1991;30(5):694-700.
180. Selmaj K, Raine CS, et al. Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J Immunol* 1991;147(5):1522-9.
181. Serafini B, Rosicarelli B, et al. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 2007;204(12):2899-912.
182. Sharief MK, Thompson EJ. Correlation of interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptor with clinical activity of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993;56(2):169-74.
183. Schumacker GA, Beebe G, et al. Problems of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis: Report by the Panel on the Evaluation of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1965;122:552-68.
184. Simon JH, Jacobs LD, et al. Magnetic resonance studies of intramuscular interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *Ann Neurol* 1998;43(1):79-87.
185. Smolders J, Hupperts R, et al. Efficacy of vitamin D(3) as add-on therapy in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis receiving subcutaneous interferon beta-1a: A Phase II, multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Neurol Sci* 2011;311(1-2):44-9.

186. Soilu-Hanninen M, Airas L, et al. 25-Hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005;11(3):266-71.
187. Soilu-Hanninen M, Laaksonen M, et al. A longitudinal study of serum 25-hydroxyvitamin D and intact parathyroid hormone levels indicate the importance of vitamin D and calcium homeostasis regulation in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79(2):152-7.
188. Spuler S, Yousry T, et al. Multiple sclerosis: prospective analysis of TNF-alpha and 55 kDa TNF receptor in CSF and serum in correlation with clinical and MRI activity. *J Neuroimmunol* 1996;66(1-2):57-64.
189. Storch MK, Piddlesden S, et al. Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol* 1998;43(4):465-71.
190. Stuve O, Marra CM, et al. Altered CD4+/CD8+ T-cell ratios in cerebrospinal fluid of natalizumab-treated patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2006;63(10):1383-7.
191. Sumaya CV, Myers LW, et al. Increased prevalence and titer of Epstein-Barr virus antibodies in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1985;17(4):371-7.
192. Sun W, Popat U, et al. Characteristics of T-cell receptor repertoire and myelin-reactive T cells reconstituted from autologous haematopoietic stem-cell grafts in multiple sclerosis. *Brain* 2004;127(Pt 5):996-1008.
193. Swanton JK, Rovira A, et al. MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study. *Lancet Neurol* 2007;6(8):677-86.
194. Tallantyre EC, Bo L., et al. Greater loss of axons in primary progressive multiple sclerosis plaques compared to secondary progressive disease. *Brain* 2009;132(Pt 5):1190-9.
195. Tappich C, Fenk R, et al. Early recurrence of rheumatoid arthritis after nonmyeloablative allogeneic blood stem cell transplantation in a patient with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2003;32(6):629-31.
196. Te Boekhorst PA, Lamers CH, et al. T-lymphocyte reconstitution following rigorously T-cell-depleted versus unmodified autologous stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 2006;37(8):763-72.
197. Tintore M, Rovira A, et al. Baseline MRI predicts future attacks and disability in clinically isolated syndromes. *Neurology* 2006;67(6):968-72.
198. Torii K, Saito C, et al. Tobacco smoke is related to Th17 generation with clinical implications for psoriasis patients. *Exp Dermatol* 2011;20(4):371-3.
199. Trapp BD, Peterson J, et al. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998;338(5):278-85.
200. Traugott U, Lebon P. Interferon-gamma and Ia antigen are present on astrocytes in active chronic multiple sclerosis lesions. *J Neurol Sci* 1988;84(2-3):257-64.
201. Vachová M. Nová epidemiologická data u RS v ČR. 6. Olomoucké neuroimunologické symposium. Olomouc 2010:s.36.
202. van Oosten BW, Barkhof F, et al. Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* 1996;47(6):1531-4.
203. Van Wijmeersch B, Sprangers B, et al. Allogeneic bone marrow transplantation in models of experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for a graft-versus-autoimmunity effect. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13(6):627-37.
204. Vaughan JH, Nguyen MD, et al. Epstein-Barr virus-induced autoimmune responses. II. Immunoglobulin G autoantibodies to mimicking and nonmimicking epitopes. Presence in autoimmune disease. *J Clin Invest* 1995;95(3):1316-27.

205. Vaughan JH, Valbracht JR, et al. Epstein-Barr virus-induced autoimmune responses. I. Immunoglobulin M autoantibodies to proteins mimicking and not mimicking Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *J Clin Invest* 1995;95(3):1306-15.
206. Venken K, Hellings N, et al. Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J Immunol* 2008;180(9):6411-20.
207. Villar LM, Garcia-Sanchez MI, et al. Immunological markers of optimal response to natalizumab in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2012;69(2):191-7.
208. Voskuhl RR, Martin R, et al. T helper 1 (Th1) functional phenotype of human myelin basic protein-specific T lymphocytes. *Autoimmunity* 1993;15(2):137-43.
209. Wagers AJ, Sherwood RI, et al. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002;297(5590):2256-9.
210. Wandinger K, Jabs W, et al. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology* 2000;55(2):178-84.
211. Weber F, Fontaine B, et al. IL2RA and IL7RA genes confer susceptibility for multiple sclerosis in two independent European populations. *Genes Immun* 2008;9(3):259-63.
212. Weiner HL. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol* 2008;255 Suppl 1:3-11.
213. Weinshenker BG, Bass B, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 2. Predictive value of the early clinical course. *Brain* 1989;112 (Pt 6):1419-28.
214. Wekerle H, Schwab M, et al. Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes. *Eur J Immunol* 1986;16(12):1551-7.
215. Wingerchuk DM, Lennon VA, et al. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006;66(10):1485-9.
216. Wynn D, Kaufman M, et al. Daclizumab in active relapsing multiple sclerosis (CHOICE study): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, add-on trial with interferon beta. *Lancet Neurol* 2010;9(4):381-90.
217. Zafranskaya M, Oschmann P, et al. Interferon-beta therapy reduces CD4+ and CD8+ T-cell reactivity in multiple sclerosis. *Immunology* 2007;121(1):29-39.
218. Zhang B, Yamamura T, et al. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 1997;186(10):1677-87.
219. Zhang J, Markovic-Plese S, et al. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 1994;179(3):973-84.
220. Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, et al. Smoking is associated with increased lesion volumes and brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology* 2009;73(7):504-10.
221. Zwemmer JN, van Veen T, et al. No major association of ApoE genotype with disease characteristics and MRI findings in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2004;10(3):272-7.

## **PŘÍLOHA č. 1 – IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM**

KRASULOVÁ, Eva. *Lymfocytární subpopulace, cytokinová produkce a transplantace kmenových buněk u pacientů s roztroušenou sklerózou.* [Lymphocyte subpopulations, cytokine production and stem cells transplantation in multiple sclerosis patients]. Praha, 2012. 92 s., 2 příl. Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Neurologická klinika a Centrum klinických neurověd. Vedoucí práce Havrdová, Eva.

## PŘÍLOHA č. 2 – SOUHRN PRACÍ AUTORKY

### A) PRÁCE S IF

**Krasulová E**, Trněný M, Kozák T et al. High-dose immunoablation with autologous haematopoietic stem cell transplantation in aggressive multiple sclerosis: a single centre 10-year experience. *Mult Scler* 2010;16(189):685-93.

IF=4.230

**Krasulová E**, Trněný M, Kozák T, Havrdová E. Autologní transplantace kmenových buněk a její současná role v léčbě roztroušené sklerózy. *Cesk Slov Neurol N* 2009;72/105(3):227-234.

IF=0.393

Marečková H, Havrdová E, **Krasulová E**, Vaňková Z, Koberová M, Šterzl I. Natalizumab in the treatment of patients with multiple sclerosis: first experience. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1110:465-73.

IF=1.930

Garren H, Robinson WH, **Krasulová E** et al. Phase 2 trial of a DNA vaccine encoding myelin basic protein for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2008;63(5):611-20.

IF=8.717

Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL, Berven FS, Brundin L, Comabella M, Franciotta D, Frederiksen JL, Fleming JO, Furlan R, Hintzen RQ, Hughes SG, Johnson MH, **Krasulova E** et al. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology* 2009;73(22):1914-22.

IF=4.633

Kopal A, Dostál V, **Krasulová E**, Ehler E. Akutní choreatický syndrom: kazuistika. *Cesk Slov Neurol Neurochir* 2007;70/103(3):336-9.

IF=0.393

**Krasulová E**, Kemlink D, Horáková D et al. Peripheral blood immunological profiling in multiple sclerosis patients and B-lymphocytes as a possible predictive marker for disability. – v recenzním řízení

**Krasulová E**, Valková V, Marková M et al. Favourable outcome in neuromyelitis optica patient after allogeneic stem cells transplantation. – v recenzním řízení

#### **B) PRÁCE BEZ IF**

Havrdová E, Horáková D, Kovářová I, **Krasulová E**. Future possibilities of the multiple sclerosis treatment. Cas Lek Cesk 2005;144(189):663-5.

**Krasulová E**, Havrdová E. Interferon beta a současná léčba relaps-remitentní roztroušené sklerózy mozkomíšní. Remedia 2007;17:560–567.

**Krasulová E**, Havrdová E. Současná léčba roztroušené sklerózy mozkomíšní. Farmakoterapie 2007;6:619-628.

**Krasulová E**, Havrdová E. Současná léčba relaps-remitentní roztroušené sklerózy a perspektivy do budoucna. Klin Farmakol Farm 2008;22(189):23-29.

**Krasulová E**, Havrdová E. Léčba relaps-remitentní roztroušené sklerózy mozkomíšní. Neurol. pro praxi 2008;9(4):218-222.

**Krasulová E**, Blahová Dušánková J, Havrdová E. Roztroušená skleróza – psychoneuroimunologické onemocnění centrálního nervového systému. Psychiat. pro Praxi 2009;10(190):67-71

**Krasulová E**. Léčba roztroušené sklerózy – současnost a trendy do budoucna. Postgrad Med 2011;13(189):8-14.

**Krasulová E**. Natalizumab v léčbě roztroušené sklerózy. Remedia 2011;5:409–411.

